

ความซุกของฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามลักษณะชนิดของฟิมเบรีย
ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยกลุ่มหนึ่ง

ปริญญาานิพนธ์
ของ
พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ตุลาคม 2549

ความซุกของฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามลักษณะชนิดของฟิมเบรีย
ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยกลุ่มหนึ่ง

บทคัดย่อ
ของ
พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ตุลาคม 2549

พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ. (2549). ความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามลักษณะชนิดของฟิมเบรียในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยกลุ่มหนึ่ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(ปริทันตวิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน, อาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ.

โรคปริทันต์เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่มีการติดเชื้อของอวัยวะที่รองรับฟันและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียฟันในผู้ใหญ่ พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียก่อโรคและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย แบคทีเรียที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ คือ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส เชื้อสามารถเข้าเกาะติดกับพื้นผิวของเซลล์เจ้าบ้านและรุกรานเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์ตามมา ฟิมเบรียเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่ช่วยในการเข้าเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้านดังกล่าว ฟิมเบรียที่ต่างชนิดกันจะมีผลต่อความสามารถและความรุนแรงของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในการก่อโรคได้แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ เพื่อหาความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบและหาความสัมพันธ์ของชนิดฟิมเบรียที่พบกับความลึกของร่องลึกปริทันต์

วิธีดำเนินการวิจัย เก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจำนวน 158 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 34 ราย โดยจำแนกตามระดับร่องเหงือกและร่องลึกปริทันต์ ส่วนกลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 14 ราย จะถูกเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างจำนวน 28 ตัวอย่าง นำคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างทั้งหมดไปทำการตรวจหาพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสด้วยวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ จากนั้นนำตัวอย่างที่ตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสไปวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียโดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของฟิมเบรียของ Amano และ Nakagawa นำผลที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับค่าทางคลินิก

ผลการวิจัย เมื่อพิจารณาการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในระดับบุคคลพบว่ากลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะตรวจพบเชื้อได้ 3 รายจาก 14 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 21.43 กลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะสามารถพบเชื้อได้ 30 รายจากผู้ป่วย 34 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 88.24 เมื่อพิจารณาในระดับตำแหน่งกลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในคราบจุลินทรีย์ได้ 5 ตัวอย่างจากคราบจุลินทรีย์ 28 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 17.86 ส่วนในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะสามารถพบเชื้อได้ 120 ตัวอย่างจากคราบจุลินทรีย์ 158 ตัวอย่างหรือคิดเป็นร้อยละ 75.95 เมื่อนำการพบเชื้อมาหาความสัมพันธ์กับค่าทางคลินิกพบว่าการพบเชื้อมีความสัมพันธ์กับค่าทางคลินิกทั้ง 4 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับความลึกของร่องเหงือก ระดับค่าการยึดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและดัชนีวัดการโยกของฟัน) นอกจากนั้นยังพบว่าตำแหน่งที่พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะมีค่าทางคลินิก คือ ความลึกของร่องลึกปริทันต์และการยึดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิกมากกว่าตำแหน่งที่ตรวจไม่พบพอร์ไฟ

โรโรแมส จิงจิวาลิส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียในตัวอย่างที่พบ
พอร์ไฟโรโรแมส จิงจิวาลิส ปรากฏว่าส่วนใหญ่ไม่สามารถระบุชนิดของฟิมเบรียได้ไม่ว่าจะด้วยการ
ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะตามแบบดำเนินการวิจัย หรือจากไพรเมอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นร่วมกับวิธีการ
แยกความแตกต่างจากขนาดผลิตภัณฑ์ จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากการใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างของ
ผู้ป่วยที่พบพอร์ไฟโรโรแมส จิงจิวาลิส ซึ่งได้ใช้ในการศึกษาวิจัยอื่นก่อนหน้านี้จำนวน 19 ตัวอย่าง
โดยเป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ไม่เป็นโรคปริทันต์อีกเสบจำนวน 9 ราย พบฟิมเบรียชนิดที่ 1 2 ราย, ฟิม
เบรียชนิดที่ 2 3 ราย และฟิมเบรียชนิดที่ 4 2 ราย ส่วนในผู้เป็นโรคปริทันต์อีกเสบจำนวน 10 ราย
พบฟิมเบรียชนิด 1 มี 2 ราย, ฟิมเบรียชนิดที่ 3 2 ราย และพบฟิมเบรียชนิดที่ 4 4 ราย

บทสรุป ความชุกของพอร์ไฟโรโรแมส จิงจิวาลิสที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าได้ผล
การศึกษาที่มีความใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นๆ ทั้งในการศึกษาถึงความชุกของเชื้อที่ได้ทำในประเทศ
ไทยหรือการศึกษาที่ทำในประเทศอื่นๆ ส่วนการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรีย พบว่าสามารถระบุชนิด
ของฟิมเบรียจากตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโรแมส จิงจิวาลิส ทั้งจากผู้ที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์
อีกเสบได้เป็นชนิดที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีจำนวนน้อยเกิน
กว่าที่จะใช้สรุปเป็นความชุกหรือหาความสัมพันธ์กับความรุนแรงทางคลินิกตามที่ได้วางแนวทางไว้

PREVALENCE OF PORPHYROMONAS GINGIVALIS fimA GENOTYPES
IN THAI PERIODONTITIS PATIENTS

AN ABSTRACT
BY
POLLAPAT CHARASCHAIWANNA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science in Periodontology
at Srinakharinwirot University
October 2006

Pollapat Charaschaiwanna. (2006). *Prevalence of Porphyromonas gingivalis fimA genotypes in Thai periodontitis patients*. Master thesis, M.S. (Periodontology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assoc. Prof. Dr. Narongsak Laosrisin, Dr. Doungporn Srisuparbh

Periodontitis is a chronic infectious disease that results in periodontal tissue destruction. Periodontitis has two main etiological components, which are interacting each other, the microorganisms and the host. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), a gram-negative and black-pigmented anaerobe, has been recognized as the causative pathogen of various types of periodontitis, especially chronic periodontitis. This organism exhibits a number of potential virulence factors, which have been implicated in the pathogenesis of adult-onset periodontitis. Fimbriae (*fimA*) have been reported as the adhesive factor of *Pg* which has wide variety of biological and immunological activities and recognized as a major virulence factor in the infection and pathogenesis of this organism.

Objectives : To investigate the prevalence of *Pg fimA* genotypes in Thai populations and their association to the severity of periodontitis.

Materials and methods : 158 subgingival plaque samples from 34 periodontitis patients and 28 subgingival plaque samples from 14 non-periodontitis patients were collected. All samples were analyzed for the presence of *Pg* by PCR technique using 16s-rRNA primers. The *Pg*-positive samples were analyzed for *fimA* genotypes by PCR technique using *fimA* specific primers recommended by Amano and Nakagawa.

Results : In the subject level, *Pg* was detected in 3 of 14 (21.43%) non-periodontitis patients and 30 of 34 (88.24%) periodontitis patients. In the site level, *Pg* was detected in 5 of 28 (17.86%) non-periodontitis patients and 120 of 158 (75.95%) periodontitis patients. *Pg*-positive samples were significantly associated with clinical parameters. The *fimA* genotype could not be identified in almost of the *Pg*-positive samples even by Amano's and Nakagawa's specific primers or by our own designed universal *fimA* primer. Finally, 19 *Pg*-positive DNA samples extracted from 9 non-periodontitis patients and 10 periodontitis patients, using in the previous study, were used to identified the *fimA* genotypes. It was indicated that the *fimA* genotypes detection assessed by our own designed primer with PCR-RFLP was more effective than using Amano's specific primers with conventional PCR. 2 samples of typeI, 3 samples of typeII, 2 samples of typeIV *Pg fimA* were detected in non-periodontitis patients while 2 samples of type1b, 2 samples of typeIII and 4 samples of

typeIV *Pg fimA* were detected in periodontitis patients. Nevertheless, 2 samples of both groups could not be identified the genotypes of *Pg fimA*.

Conclusion : The result of this study showed the similar *Pg* prevalence to the other previous studies both performed in Thai population and other countries. For the *Pg fimA* identification, *Pg*-positive samples exhibited the differences in *fimA* genotypes in group of non-periodontitis and group of periodontitis patients. However, prevalence of *Pg fimA* genotypes and its relation to the disease severity could not be explained from this study because of the limitation of sample size.

ความซุกของฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามลักษณะชนิดของฟิมเบรีย
ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยกลุ่มหนึ่ง

ปริญญานิพนธ์
ของ
พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา
ตุลาคม 2549
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

ความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามลักษณะชนิดของฟิมเบรีย
ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยกลุ่มหนึ่ง

ของ
พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาปริทันตวิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)
วันที่ เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2549

..... ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน)

..... กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์
(อาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิงทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์)

..... กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นวรรตน์ วราอัศวปติ เจริญ)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์ ดร.ณรงค์ศักดิ์ เหล่าศรีสิน ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง ข้อคิดเห็นและข้อมูลต่างๆที่มีประโยชน์ต่อการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ทิพาพร วงศ์สุรสิทธิ์, รองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง เพ็ญพรรณ เลหาพันธ์ และรองศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ดร.นวรรตน์ วราวัศปติ เจริญ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบเค้าโครงและสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆของการวิจัยรวมทั้งให้ความกรุณาช่วยตรวจแก้ไขปริญญานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ฤดี สุราฤทธิ์, รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชพิน ศรีสัจจะลักษณ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทันตแพทย์หญิง ศลักษณา กาญจนะวสิต และอาจารย์ ทันตแพทย์ อเนก ชยสดมภ์ สำหรับพอรีไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสสายพันธ์มาตรฐาน ATCC33277, W50 และ extracted DNA ของเชื้อมาตรฐานทั้ง 2 สายพันธ์

ขอขอบคุณทันตแพทย์หญิง วรารัตน์ เสวตศิลป์ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อดีเอ็นเอตัวอย่างทั้ง 19 ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดโดยชุดสกัดดีเอ็นเอ Instagene Matrix

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโษษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้เป็นที่รักยิ่ง ซึ่งให้การสนับสนุนและให้กำลังใจเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
กรอบแนวคิดในการทำวิจัย.....	5
สมมติฐานในการวิจัย.....	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
โรคปริทันต์และแบคทีเรียก่อโรค.....	6
บทบาทของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในโรคปริทันต์อักเสบ.....	8
ปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส.....	10
กลไกการรุกรานของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสต่อโรคปริทันต์อักเสบ.....	15
ฟิมเบรีย.....	19
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
การกำหนดประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง.....	24
ขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัย.....	24
การจัดกระทำและวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
4 ผลการวิจัย.....	34
ข้อมูลทางคลินิก.....	34
การตรวจหาพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากคราบจุลินทรีย์.....	36
ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับภาวะ	
การเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ.....	38
ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับค่า	
ทางคลินิกในระดับตำแหน่งของกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ.....	38
การตรวจวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียจากตัวอย่างที่พบ	
พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส.....	41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายผลและบทสรุป.....	49
อภิปรายผล.....	49
บทสรุป.....	66
 บรรณานุกรม.....	 67
 ประวัติย่อผู้วิจัย.....	 76

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1 สารที่ถูกหลั่งมาจากเซลล์ต่างๆเมื่อได้รับการกระตุ้นจากพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส และปัจจัยก่อโรคของเชื้อ.....	23
2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อพีเบรียชนิดที่ 1-5.....	27
3 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่ร่วมในการศึกษาครั้งนี้.....	34
4 ภาพทางคลินิกที่ตรวจพบในตำแหน่งที่ทำการเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง.....	35
5 จำนวนตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสจากวิธีพีซีอาร์โดยตรวจพบ ยีน16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของเชื้อ.....	37
6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางคลินิก 4 ชนิดกับการพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ.....	39
7 การพบยีนฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส โดยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ สำหรับยีนฟิมเบรีย ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ.....	44
8 ชนิดของฟิมเบรียที่สามารถจำแนกได้จากผู้ป่วยในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ.....	45
9 ชนิดของฟิมเบรียที่พบจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอ InstaGene™ Matrix.....	48
10 การศึกษาเรื่องความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสโดยวิธีพีซีอาร์.....	52

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1 กลุ่มของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง.....	2
2 พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ ATCC 33277 และฟิมเบรีย ที่อยู่บริเวณพื้นผิว.....	11
3 การรุกรานของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสู่เซลล์บุผิวเนื้อเยื่อเหงือก.....	17
4 ความซุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามชนิดของฟิมเบรียที่พบ ในผู้ป่วยโรคปริทันต์.....	21
5 การพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ.....	37
6 ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับความลึก ของร่องเหงือกและค่าการยึดเกาะทางคลินิก.....	40
7 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย.....	42
8 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	43
9 ภาพแถบดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรียชนิด 1 ปีและชนิดที่ 2 หลังการทำปฏิกิริยา กับเอนไซม์เฮ3.....	44
10 พบดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรีย 2 ชนิดในคราบจุลินทรีย์เดียวกันหลังการทำ ปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3.....	46
11 การจัดเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิดต่างๆ.....	57
12 ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการศึกษาด้วยไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย.....	62
13 ขนาดชั้นดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรียชนิดต่างๆ ภายหลังจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ถูกตัดด้วยเอนไซม์เฮ3.....	62
14 ขนาดชั้นดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรียชนิดต่างๆที่5 ภายหลังจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ถูกตัดด้วยเอนไซม์อาร์ซา1.....	63

บทที่ 1

บทนำ

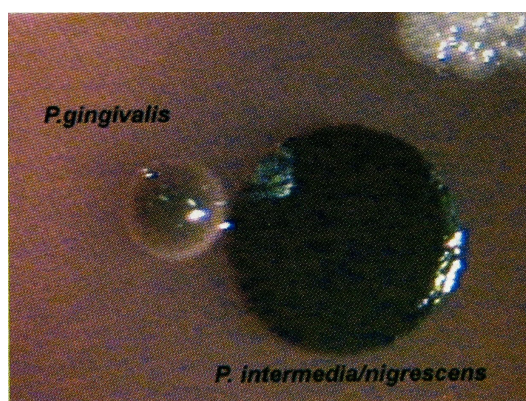
ภูมิหลัง

โรคปริทันต์ (periodontal disease) เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่มีการติดเชื้อของอวัยวะที่รองรับฟัน โรคปริทันต์เป็นโรคที่พบได้อย่างแพร่หลายในประชากรกว่า 90% และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียฟันในผู้ใหญ่ กระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในโรคปริทันต์นั้นจะลุกลามจากส่วนของเหงือก (gingiva) ถึงเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) และกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) ก่อให้เกิดการละลายของกระดูกเบ้าฟัน ฟันโยก มีอาการปวดและนำไปสู่การสูญเสียฟันในที่สุด⁽¹⁾ ทั้งนี้โรคปริทันต์ที่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์จนเกิดลักษณะของร่องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) ร่วมกับการสูญเสียการยึดเกาะของอวัยวะปริทันต์ (loss of attachment) จะเรียกว่าโรคปริทันต์อักเสบ (periodontitis) นอกจากนี้การติดเชื้อของโรคปริทันต์ยังสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือดและส่งผลเสียต่อโรคทางระบบอื่นๆ ด้วย เช่น โรคของระบบทางเดินหายใจ (respiratory disease) โรคของระบบหลอดเลือดและหัวใจ (cardiovascular disease) รวมทั้งโรคเบาหวาน (diabetes mellitus)⁽²⁾

พยาธิกำเนิดของโรคปริทันต์อักเสบเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่างที่สำคัญได้แก่ เชื้อก่อโรคและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host immune response)^(1,3) คราบจุลินทรีย์ (dental plaque) ที่สะสมอยู่บนผิวฟันบริเวณขอบเหงือกประกอบด้วยเชื้อก่อโรคหลายชนิด เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์ คือ แบคทีเรีย ซึ่งประกอบไปด้วยแบคทีเรียหลายชนิดหลายสายพันธุ์ แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความสามารถและบทบาทในการดำเนินโรคได้แตกต่างกัน ดังนั้นในการเกิดและการดำเนินของโรคปริทันต์จึงนำไปสู่โรคปริทันต์อักเสบนั้น จะต้องอาศัยชนิดของแบคทีเรียที่มีความจำเพาะ อย่างไรก็ตามในคนปกติที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบก็สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคปริทันต์อักเสบได้เช่นกัน ซึ่งพบว่าการที่บุคคลตรวจพบเชื้อก่อโรคแต่ไม่ได้เป็นโรคปริทันต์อักเสบนั้นน่าจะมีสาเหตุมาจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ที่มีความสมดุลกับเชื้อจึงสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ อีกทั้งความสามารถในการก่อโรคของเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันก็ส่งผลต่อกระบวนการก่อโรคและการดำเนินไปของโรคได้แตกต่างกัน ปัจจัยก่อโรคของเชื้อจึงน่าจะมีความสามารถและบทบาทต่อการเกิดโรคที่ต่างกันด้วย

จากการตรวจชนิดของแบคทีเรียที่เกาะอยู่ที่ผิวฟันและบนเนื้อเยื่อในช่องปากจะพบแบคทีเรียมากกว่า 300 ชนิดอาศัยอยู่ที่บริเวณดังกล่าว แบคทีเรียที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นสาเหตุของโรคปริทันต์อักเสบ คือ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลลิส (*Porphyromonas gingivalis*; Pg) และเชื้อแอคติโนแบซิลัส แอคติโนมายซิเทมโคมิแทนส์ (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Aa)⁽⁴⁾ พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิวัลลิส (ภาพประกอบ 1) เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ สร้างเม็ดสีดำ ไม่ใช่

ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (black-pigmented gram-negative anaerobic rod) ปัจจัยก่อโรคของ พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่ก่อให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์มีอยู่หลายชนิด เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ฟิมเบรีย (fimbriae; *fimA*) ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin) และโปรตีเอส (proteases) เป็นต้น ปัจจัยก่อโรคเหล่านี้ทำให้พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสสามารถ ก่อตัวอยู่ในร่องเหงือกและรุกรานเข้าสู่เนื้อเยื่อเหงือกและอวัยวะปริทันต์ข้างใต้ รวมทั้งสามารถ กระตุ้นการตอบสนองของร่างกายในบริเวณดังกล่าวได้ ในการตอบสนองของร่างกายเซลล์ของระบบ ภูมิคุ้มกันจะมีการเพิ่มการผลิตและปล่อยสารอักเสบ (inflammatory mediators) ต่างๆออกมา ซึ่ง สารอักเสบเหล่านี้ก่อให้เกิดการทำลายของอวัยวะปริทันต์รวมทั้งเกิดการทำลายของกระดูกเบ้าฟัน นอกจากนี้พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสยังส่งผลให้เกิดการสูญเสียกระดูกรอบๆซี่ฟัน โดยกระตุ้นการ หลั่งสารไซโตไคน์ (cytokines) ออกมาจากเซลล์ของร่างกาย มีผลทำให้เกิดการละลายตัวของกระดูก มากขึ้นและทำให้เกิดการทำลายกระดูกเบ้าฟันในที่สุด นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการยับยั้งการสร้าง กระดูกอีกด้วย⁽⁵⁾ ระดับความรุนแรงและความรวดเร็วในการทำลายอวัยวะปริทันต์นั้นจะมีความ แตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับระดับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของแต่ละคน รวมทั้งจำนวน ชนิด และสายพันธุ์ของแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นสาเหตุดังกล่าว



ภาพประกอบ1 กลุ่มของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ในสภาวะธรรมชาติการก่อโรคของเชื้อนั้น ขั้นตอนแรกจะต้องมีการเกาะติดของเชื้อบน พื้นผิวของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เชื้อจะทำการรุกรานก่อน จากนั้นจึงเริ่มมีการรวมกลุ่มของเชื้อและมีการเพิ่มจำนวนเพื่อรุกรานเซลล์และเนื้อเยื่อต่อไป จากการศึกษาพบว่าฟิมเบรียเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส โดยฟิมเบรียเป็นส่วนประกอบหนึ่งบนพื้นผิวของ พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่มีบทบาทสำคัญที่ทำให้พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสสามารถเกาะติดกับ พื้นผิวของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) และช่วยให้พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสสามารถรุกรานเข้าสู่เซลล์ เจ้าบ้านได้ ฟิมเบรียที่ต่างชนิดกันจะมีผลต่อความสามารถและความรุนแรงของพอร์ไฟโรโมแนส

จึงพิจารณาในการก่อโรคได้แตกต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการแบ่งพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาตามลักษณะของฟิมเบรียที่ปรากฏอยู่ได้เป็น 6 ชนิด ซึ่งพบว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 (type II *fimA*) จะถูกตรวจพบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ⁽⁶⁻⁸⁾ นอกจากนี้ในรอยโรคปริทันต์อักเสบที่มีระดับความรุนแรงมากขึ้นจะมีโอกาสตรวจพบฟิมเบรียชนิดที่ 2 ได้มากขึ้น ฟิมเบรียชนิดที่ 2 จึงน่าจะเป็นฟิมเบรียชนิดที่มีบทบาทต่อโรคปริทันต์อักเสบมากกว่าฟิมเบรียชนิดอื่นๆ⁽⁶⁾ อีกทั้งยังพบหลักฐานที่แสดงว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 นี้ มีความเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดเชื้อพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาระหว่างบุคคลอีกด้วย⁽⁸⁾ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Beikler และคณะ⁽⁷⁾ ในปีค.ศ. 2003 ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฟิมเบรียกับระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้ทราบถึงความสำคัญของชนิดฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาว่ามีความสำคัญต่อการเกิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบทั้งจากการช่วยให้พอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาสามารถรุกรานเซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกายและยังมีส่วนกระตุ้นเซลล์ของร่างกายให้ปล่อยสารต่างๆออกมา ซึ่งจะส่งผลกลับมาทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายด้วยเช่นกัน งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นถึงการหาความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาตามลักษณะชนิดของฟิมเบรียในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยกลุ่มหนึ่ง เพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรคปริทันต์อักเสบและพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มีความมุ่งหมายเพื่อ

1. หาความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาตามลักษณะของฟิมเบรียแต่ละชนิดที่ตรวจพบในกลุ่มประชากรคนไทยกลุ่มหนึ่ง
2. หาความสัมพันธ์ของชนิดฟิมเบรียที่พบกับความลึกของร่องลึกปริทันต์

ความสำคัญของการวิจัย

ความแตกต่างในชนิดของฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดและดำเนินไปของโรคปริทันต์ จึงมีคุณค่าในการนำมาใช้ติดตามผลการรักษาและประเมินสภาวะของโรค อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆและยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคด้วย รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันก็มีผลต่อระดับความรุนแรงของรอยโรครวมทั้งมีผลต่อการแสดงออกของปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหาย เช่น โปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงปัจจัยก่อโรคต่างๆ ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาในเรื่องฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมนเนส จึงพิจารณาเป็นการศึกษาวิจัยในต่างประเทศ คือในประเทศทางแถบยุโรปและประเทศญี่ปุ่นเท่านั้น ผลการศึกษาที่ได้มีความแตกต่างกัน โดยผลการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น⁽⁶⁾ พบว่าชนิดของฟิมเบรียมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคปริทันต์ แต่การศึกษาในประเทศเยอรมัน⁽⁷⁾ ไม่พบความสัมพันธ์ของฟิมเบรียกับความรุนแรงของโรคปริทันต์

อักเสบ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทย การวิจัยครั้งนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสตามชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทย ข้อมูลที่ได้จะเป็นข้อมูลจากกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบคนไทยที่พบการเกิดโรค ผลการศึกษาที่ได้จะทำให้ทราบถึงความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสตามชนิดของฟิมเบรียและทราบความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฟิมเบรียกับระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ รวมทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาหาแนวทางการรักษาและป้องกันการเกิดโรคปริทันต์อักเสบต่อไป เช่น การหาแนวทางการป้องกันฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสเข้าเกาะติดเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกาย เมื่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสไม่สามารถเข้าเกาะติดกับเซลล์ได้หรือมีการเกาะติดที่ด้อยลงจะมีผลให้ความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบลดลงตามไปด้วย

ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย

ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาทางทันตกรรม

- โรงพยาบาลคำชะอี อำเภอคำชะอี จังหวัดมุกดาหาร
- โรงพยาบาลแม่ฟ้าหลวง อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย
- โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
- คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

1. กลุ่มควบคุม ได้แก่ ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาทางทันตกรรมและไม่พบว่าเป็นโรคปริทันต์อักเสบ
2. กลุ่มศึกษา ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจพบว่าเป็นโรคปริทันต์อักเสบตามหลักเกณฑ์การแยกประเภทของโรคปริทันต์ ในปี 1999 (Classification of AAP 1999) และตรงตามหลักเกณฑ์ของการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 48 ราย

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ ได้แก่ สภาวะและระดับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบที่ตรวจพบจากทางคลินิก
2. ตัวแปรตาม ได้แก่ การพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิสตามลักษณะชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบจากคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง

คำสำคัญ

Porphyromonas gingivalis, Fimbriae, *fimA*, Periodontitis

กรอบแนวคิดในการทำวิจัย

โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์แบบเรื้อรัง ใช้เวลาในการเกิดและดำเนินของโรคเป็นระยะเวลานาน โดยสาเหตุของการเกิดโรคนั้นนอกเหนือจากการรักษาสุขภาพช่องปากที่ไม่ดีแล้ว การติดเชื้อและการรุกรานของเชื้อก่อโรครวมทั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเองก็เป็นสาเหตุที่สำคัญเช่นกัน เชื้อก่อโรคปริทันต์นั้นส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจนซึ่งมีอยู่หลายชนิดหลายสายพันธุ์ด้วยกัน โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดต่างมีบทบาทแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามเชื้อแต่ละชนิดนั้นล้วนสามารถปล่อยสารพิษเพื่อทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อได้และกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของเซลล์และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายซึ่งในที่สุดแล้วก็จะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อตามมา

ในบรรดาเชื้อก่อโรคนั้น พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ได้รับการยอมรับว่ามีความสำคัญต่อการเกิดโรคปริทันต์อักเสบ ในการรุกรานและก่อโรคของเชื้อนี้ ขั้นตอนแรกต้องมีการเกาะติดของเชื้อต่อพื้นผิวของเนื้อเยื่อหรือเซลล์จึงจะเกิดการรุกรานต่อไปได้ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะอาศัยฟิมเบรียเป็นตัวเกาะยึดกับพื้นผิวดังกล่าว พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีอยู่หลากหลายสายพันธุ์แต่เมื่อทำการจัดกลุ่มของเชื้อตามลักษณะของฟิมเบรียที่ตรวจพบจะพบว่าในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม ตามลักษณะการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของฟิมเบรีย เชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีฟิมเบรียเพียง 1 ชนิดเท่านั้น ซึ่งฟิมเบรียที่แตกต่างกันจะทำให้เชื้อมีความสามารถในการเกาะติดที่ต่างกัน นั่นก็คือมีผลทำให้ความสามารถในการรุกรานของเชื้อต่อเนื้อเยื่อและเซลล์เป้าหมาย (target cell) แตกต่างกันไปด้วย ดังนั้นการที่พบว่าโรคปริทันต์อักเสบที่มีมากกว่า 1 ประเภทหรือมีความรุนแรงของการทำลายที่ต่างกันในแต่ละตำแหน่งต่างๆในช่องปาก อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากการมีสายพันธุ์เชื้อก่อโรคที่ต่างกัน ดังนั้นการทราบถึงประเภทของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามชนิดของฟิมเบรีย และสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบและความรุนแรงของโรคปริทันต์ได้นั้น น่าจะเป็นความรู้ที่สำคัญในการหาทางป้องกันรักษาโรคปริทันต์อักเสบและใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการศึกษาอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

สมมติฐานในการวิจัย

1. ความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสตามชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบ มีความแตกต่างกัน
2. ชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์กับความลึกของร่องลึกปริทันต์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. โรคปริทันต์และแบคทีเรียก่อโรค
2. บทบาทของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิสในโรคปริทันต์อักเสบ
3. ฟิมเบรีย

โรคปริทันต์และแบคทีเรียก่อโรค

โรคปริทันต์เป็นโรคที่มีการติดเชื้อและอักเสบของอวัยวะที่รองรับฟัน ซึ่งระดับความรุนแรงของโรคนั้นมีตั้งแต่ระดับการอักเสบของเหงือกเพียงเล็กน้อยที่สามารถรักษาให้เกิดการหายได้จนถึงระดับความรุนแรงของโรคที่มีการทำลายอวัยวะปริทันต์ (เหงือก เอ็นยึดปริทันต์และกระดูกเบ้าฟัน) มากขึ้นจนเกิดการสูญเสียฟันในที่สุด เมื่อโรคปริทันต์มีระดับการทำลายของโรคที่รุนแรงมากขึ้นจากโรคเหงือกอักเสบก็จะกลายเป็นโรคปริทันต์อักเสบ พบการสูญเสียกระดูกเบ้าฟันและพอร์องลึกปริทันต์ (periodontal pocket) รวมทั้งพบการสูญเสียระดับการยึดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ (loss of attachment levels) โรคปริทันต์อักเสบเป็นโรคที่พบการอักเสบและเกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์เป็นอย่างมาก เกิดจากเชื้อก่อโรค⁽⁹⁾ และการตอบสนองของร่างกายผู้ป่วยเอง ในแต่ละคนจะมีระดับการตอบสนองที่แตกต่างกันออกไป^(9,10) เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคปริทันต์คือแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต (Gram-negative anaerobe bacteria) ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อหลายชนิดหลายสายพันธุ์ ในการเกิดของโรคและการดำเนินไปของโรคปริทันต์จะต้องอาศัยแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เชื้อแต่ละชนิดจะมีความสามารถและบทบาทในการดำเนินโรคปริทันต์ที่แตกต่างกัน ในการเกิดและดำเนินไปของรอยโรคในโรคปริทันต์ทั้งโรคเหงือกอักเสบบางชนิดและโรคปริทันต์อักเสบจะต้องอาศัยชนิดของแบคทีเรียที่มีความจำเพาะ

ในช่องปากของมนุษย์สามารถพบแบคทีเรียได้มากกว่า 300 ชนิด บางชนิดสามารถพบได้ในบางช่วงเวลาเท่านั้น ในขณะที่บางชนิดสามารถพบได้เสมอในคราบจุลินทรีย์ที่ผิวฟัน (dental plaque) การอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมเพื่อเอื้อแก่การดำรงชีวิตของพวกมันเอง อย่างไรก็ตามแม้ว่าแบคทีเรียต่าง ๆ เหล่านี้จะอาศัยอยู่ในบริเวณใกล้กับบริเวณที่มีเลือดมาเลี้ยงมาก เช่น ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเหงือก (gingival connective tissue) เนื้อเยื่อปริทันต์ (periodontal tissue) แต่จะพบการก่อโรคทางระบบของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ได้น้อยมากในผู้ป่วยที่มีสุขภาพร่างกายแข็งแรง ซึ่งเป็นผลมาจากการที่มีระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ดีที่สามารถช่วยป้องกันการรุกรานของแบคทีเรียสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้⁽⁹⁾

สภาวะสมดุลจะเกิดได้จากเชื้อแบคทีเรียและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย คราบแบคทีเรียจะเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเอง ในขณะที่ร่างกายจะมีระบบภูมิคุ้มกันที่ต่อต้านแบคทีเรียเหล่านี้ ในภาวะที่ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันที่ด้อยลง แบคทีเรียจะมีบทบาทที่เด่นขึ้นมาและทำให้เกิดการอักเสบที่ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อต่างๆขึ้น⁽⁹⁾ เหตุผลหนึ่งที่อธิบายถึงในคนปกติที่ไม่เป็นโรคปริทันต์ก็สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคได้เนื่องมาจาก ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีความสมดุลกับเชื้อ จึงสามารถยับยั้งการก่อโรคของเชื้อได้ ดังนั้นในการเกิดโรคปริทันต์จึงมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงความสมดุลระหว่างเชื้อก่อโรคกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

แบคทีเรียในช่องปากสามารถเกาะติดกับพื้นผิวภายในช่องปากได้ทั้งเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue) เช่น ฟันและเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) เช่น เยื่อบุช่องปาก เยื่อบุข้างแก้มและลิ้น โดยแบคทีเรียจะมีการรวมตัวและจับตัวสะสมในลักษณะที่เรียกว่า ไบโอฟิล์ม (biofilm) การก่อตัวของไบโอฟิล์มเริ่มจากการที่เนื้อเยื่อภายในช่องปากถูกปกคลุมด้วยแผ่นฟิล์มบางๆที่เรียกว่าเพลลิเคิล (pellicle) ซึ่งประกอบไปด้วยแร่ธาตุที่อยู่ในน้ำลายและสารจากซีรัม โมเลกุลที่อยู่ในเพลลิเคิลนั้นจะมีคุณสมบัติเสมือนเป็นตัวรับ (receptor) สำหรับการจับกับแบคทีเรีย เมื่อเพลลิเคิลจับอยู่กับผิวฟันแล้วแบคทีเรียกลุ่มแรกจะเริ่มมาสะสมบนผิวฟันโดยการจับกับพื้นผิวของเพลลิเคิลนั่นเอง เชื้อเหล่านี้ได้แก่เชื้อในกลุ่มของสเตรปโตคอคโค (oral streptococci) และแอคติโนไมเซส เนสสันดิกาย (*Actinomyces naeslundii*) รวมทั้งแอคติโนมัยเซส วิสโคซัส (*Actinomyces viscosus*) ต่อมาพอร์ไฟโรโมนเนส จึงจุฬาลิสงส์จะเข้ามาจับกับเชื้อในกลุ่มดังกล่าวได้⁽¹⁰⁻¹³⁾ นอกจากนี้ภายหลังจากที่พอร์ไฟโรโมนเนส จินจุฬาลิสงส์มีการสะสมบนคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) แล้ว ยังสามารถทำให้เชื้อในกลุ่มอื่นๆมาจับได้อีก เช่น ฟิวโซแบคทีเรีย นิวคลีโอตัม (*Fusobacterium nucleatum*) เทรโปนีมา เดนติโคลา (*Treponema denticola*) และแทนเนเรลา ฟอริไซเทนซิส (*Tannerella forsythensis*)⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ การจับกันดังกล่าวไม่เพียงแต่เป็นการอยู่ร่วมกันเท่านั้นแต่ยังเป็นการช่วยส่งเสริมซึ่งกันและกันในความสัมพันธ์ด้านอาหารและกลไกการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์⁽⁹⁾

ในการจำแนกประเภทของโรคปริทันต์นั้นจะอาศัยลักษณะต่างๆของรอยโรค ทั้งความรุนแรงของรอยโรค ระยะเวลาในการดำเนินของโรค จำนวนซี่ฟันที่เกิดโรคและกลุ่มอายุของผู้ป่วยที่เป็นโรค โดยทั่วไปแล้วในผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่ที่มีการทำลายของโรคที่รุนแรงจะพบว่ารอยโรคมีความเกี่ยวข้องกับจำนวนของแบคทีเรียชนิดแกรมลบไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งเชื้อในกลุ่มดังกล่าวที่มีความสำคัญในการเกิดและดำเนินไปของรอยโรคก็คือ พอร์ไฟโรโมนเนส จินจุฬาลิสงส์ เชื้อชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงและชนิดของโรคปริทันต์⁽⁹⁾ องค์ประกอบของพอร์ไฟโรโมนเนส จินจุฬาลิสงส์ที่ก่อให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายนั้นมีอยู่หลายชนิด เช่น ฟิมเบรีย ไลโปโพลีแซคคาร์ไลด์ แคปซูล (capsules) และเอนไซม์ (enzyme)⁽¹⁷⁾ อย่างไรก็ตามพอร์ไฟโรโมนเนส จินจุฬาลิสงส์สามารถพบได้ในเหงือกของคนปกติที่ไม่มีการอักเสบได้⁽¹⁸⁻²⁰⁾ ดังเช่นที่ได้กล่าวไปแล้วว่า โรคปริทันต์นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับเชื้อก่อโรคเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับทอพอซิสของร่างกายผู้ป่วย ความเครียด และสิ่งแวดล้อมต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วยังขึ้นกับสายพันธุ์ของ

เชื้อก่อโรคเอง เช่น พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ในสายพันธุ์ต่าง ๆ มีความสามารถในการก่อโรคได้แตกต่างกันโดยสามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรัง (chronic periodontitis) และโรคปริทันต์อักเสบแบบรุกราน (aggressive periodontitis)

โรคปริทันต์อักเสบที่มีการดำเนินของโรคที่รุนแรงมากขึ้นจะมีผลทำให้เนื้อเยื่อรองรับ (supporting tissue) และกระดูกมีจำนวนลดลง ซึ่งจำนวนของเชื้อก่อโรคที่เพิ่มขึ้นก็มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเช่นกัน พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส และแอคตินोแบซิลลัส แอคตินอมัยซิเตมโคมิแทนส์ เป็นแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับการก่อโรคปริทันต์อักเสบ ในการเกิดโรคปริทันต์อักเสบนั้นไม่ได้อาศัยเพียงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งในการก่อโรคแต่อาศัยเชื้อหลายชนิดในการก่อโรคร่วมกัน ซึ่งจะอยู่ร่วมกันเป็นลักษณะของการเป็นกลุ่มเชื้อที่มีการพึ่งพากัน เชื้อแต่ละชนิดมีความสามารถในการก่อโรคได้ต่างกันไป เช่น เชื้อในกลุ่มฟิวโซสไปโรคีต (fusospirochetal complex) ที่ก่อโรคหัวใจชนิดวินเซนต์ (vincent's angina) มีลักษณะเหมือนกับโรคเหงือกอักเสบชนิดวินเซนต์ (vincent's gingivitis) หรือ โรคเหงือกอักเสบชนิดเนื้อตายแบบเฉียบพลัน (acute necrotizing ulcerative gingivitis; ANUG) ส่วนในกลุ่มเชื้ออื่นๆซึ่งรวมถึงกลุ่มเชื้อที่ประกอบไปด้วยฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม, แบคทีเรียรอยดิส ฟอร์ซัยทัส, พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส และกลุ่มเชื้อที่ประกอบไปด้วยพรีโวเทลลา อินเตอร์มีเดีย (*P.intermedia*) ร่วมกับสเตรปโตคอคคัส อินเตอร์มีเดียส (*streptococcus intermedius*) ทั้ง 2 กลุ่มเชื้อ (complex) จะมีความเกี่ยวข้องกับบริเวณที่มีรอยโรคปริทันต์รุนแรง⁽⁹⁾

นอกจากนั้นในระหว่างแบคทีเรียต่างชนิดกันจะสามารถพบความสัมพันธ์กันได้ เช่น สเตรปโตคอคคัสคริสตา (*streptococcus crista*) จะมีส่วนในการจับกันระหว่างทรีโพนีมา เด็นติโคลา, แบคทีเรียรอยดิส ฟอร์ซัยทัส และพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ส่วนแบคทีเรียรอยดิส ฟอร์ซัยทัส และเปปโตสเตรปโตคอคคัส ไมโครส (*peptostreptococcus micros*) จะไม่สามารถดำรงชีวิตร่วมกันได้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ในทางกลับกันในตำแหน่งที่พบแบคทีเรียรอยดิส ฟอร์ซัยทัส มักจะพบฟิวโซแบคทีเรียม นิวคลีเอตัม เนื่องจากการเอื้อประโยชน์ในด้านอาหารแก่กัน ในลักษณะเดียวกันจะพบพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ในตำแหน่งที่พบเชื้อในกลุ่มแอคตินอไมเซส (*actinomyces*) แต่จะไม่พบพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เมื่อพบเชื้อในกลุ่มสเตรปโตคอคคัส ออรัลลิส (*streptococcus oralis*; *streptococcus sanguis II*) และแคปโนซัยโตฟากา สปุติเจนา (*capnocytophaga sputigena*)⁽⁹⁾

บทบาทของพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ในโรคปริทันต์อักเสบ

พอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีความสัมพันธ์เป็นอย่างมากกับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ นอกจากนั้นพอร์ไฟโรโมนัส จิงจิवालิส ยังมีปัจจัยก่อโรคมามากมายที่ช่วยให้เชื้อสามารถรุกรานเนื้อเยื่อและเกิดลักษณะของโรคที่มีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น⁽²¹⁾

สามารถพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้บ่อยในบริเวณที่มีระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์มากๆ (deep periodontal pocket) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่พบการดำเนินของโรคอย่างต่อเนื่อง (active sites) ในขณะที่จะพบว่าแอคติโนแบคทีเรียแอคติโนมัยซิเทมโคมิแทนส์มีความเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบแบบรุนแรง (aggressive periodontitis) การดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบจะเร็วหรือช้า และมีความรุนแรงของรอยโรคมากน้อยเพียงใดล้วนมีความเกี่ยวข้องกับการกำจัดแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ จำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้นจะมีโอกาสที่ทำให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ที่มากขึ้นด้วย ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเป็นไปอย่างซับซ้อนไม่ตรงไปตรงมา ดังนั้นการเกิดโรคปริทันต์อักเสบจึงไม่เพียงแต่อาศัยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคเท่านั้น แต่โรคปริทันต์อักเสบยังเป็นผลมาจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย⁽²²⁾

ในการก่อโรคปริทันต์โดยพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสนั้น เชื้อจะเข้าสู่ช่องปากในครั้งแรกด้วยการถ่ายทอดจากผู้ที่มีการติดเชื้อแล้วไปยังบุคคลอื่น⁽²³⁾ โดยอาศัยน้ำลายเป็นตัวกลางที่สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อ อย่างไรก็ตามบุคคลที่อยู่ในครอบครัวเดียวกัน เช่น คู่สมรสและบุตรพบว่าไม่มีความจำเป็นที่จะต้องพบว่ามีพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในสายพันธุ์เดียวกัน⁽²⁴⁾ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีอยู่หลากหลายสายพันธุ์ การจำแนกสายพันธุ์ดังกล่าวขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้ในการศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์⁽²⁵⁻²⁷⁾

ในการเกิดโรคปริทันต์นั้นจะมีการจับกันของเชื้อก่อโรคอย่างจำเพาะภายในช่องปาก ร่างกายจะมีกลไกป้องกันการรวมกลุ่มของเชืวดังกล่าว ทั้งการขยับของลิ้น การหลั่งของน้ำลาย รวมทั้งการหลั่งของน้ำร่องเหงือก (GCF) นอกจากนั้นแล้วส่วนประกอบของน้ำลายยังมีส่วนช่วยในการรวมกันของเชื้อก่อโรคเพื่อให้ง่ายต่อการกำจัดโดยกลไกอื่นๆของร่างกาย อย่างไรก็ตามเมื่อกลไกของร่างกายไม่สามารถกำจัดกลุ่มเชืวดังกล่าวออกไปได้ เชื้อก่อโรคเหล่านั้นจะมีการสะสมตัวกลายเป็นคราบจุลินทรีย์อยู่บนเนื้อเยื่ออ่อนและเนื้อเยื่อแข็งภายในช่องปาก พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะเป็นเชื้อในกลุ่มท้ายๆที่สะสมในคราบจุลินทรีย์ ทั้งนี้ในการรวมกลุ่มของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสนั้น จำเป็นต้องอาศัยเชื้อชนิดอื่นๆเข้าจับกลุ่มร่วมกันก่อนเพื่อให้เกิดภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ซึ่งภาวะดังกล่าวจะประกอบไปด้วยการมีชนิดของเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆที่เอื้อต่อการเข้าจับของเชื้อ มีอาหารเพียงพอและมีออกซิเจนปริมาณต่ำที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ⁽²⁸⁾

ในการรุกรานของเชือนั้นจะต้องมีการเกาะติดกับพื้นผิวก่อนเพื่อให้เอื้อต่อการรุกรานสู่เนื้อเยื่อ สำหรับพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสนั้นมีปัจจัยก่อโรค (virulence factors) ที่สำคัญที่ใช้ในการเกาะติดกับพื้นผิวคือ ฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินิน และเมมเบรนโปรตีนส่วนนอก (outer membrane proteins) นอกจากนั้นแล้วพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสยังจะมีปัจจัยก่อโรคอื่นๆมาช่วยในการรุกรานและทำลายเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ แคปซูลและโปรตีนเอส โดยทั้งฟิมเบรียและฮีแมกกลูตินินจัดเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการยึดติด (adhesin molecules) ที่ช่วยในการ

เกาะติดกับพื้นผิวของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ เพื่อให้พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสามารถรุกรานได้ง่ายยิ่งขึ้น⁽²⁸⁾

ปัจจัยก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ในการติดเชื้อแบคทีเรียสู่ร่างกายหรือเซลล์มีลำดับขั้นตอนดังนี้ คือ การเกาะติดกับเซลล์เจ้าบ้าน (attachment to host cells) การเจริญเติบโตของเชื้อ (proliferation of organisms) การหลีกเลี่ยงจากเซลล์ป้องกัน (avoidance of phagocytes) และสุดท้ายคือ การทำลายเซลล์ของร่างกาย (damage to host cells)⁽²²⁾

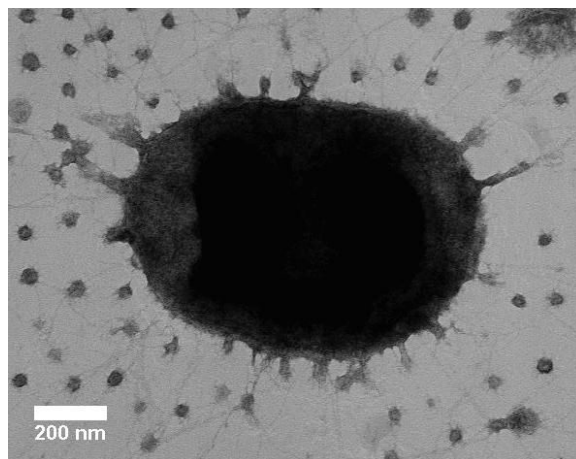
สำหรับพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสนั้นจะพบว่าเชื้อเองจะมีปัจจัยก่อโรคต่างๆมาช่วยในการรุกรานเซลล์ของร่างกายและป้องกันเชื้อจากการถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งปัจจัยก่อโรคต่างๆของเชื้อจะทำให้เกิดการตอบสนองจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายตามมา

นับตั้งแต่การรายงานครั้งแรกในการศึกษาของ Mouton และคณะ⁽²⁹⁾ ในปีค.ศ. 1981 ถึงระดับที่เพิ่มขึ้นของอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบแบบเรื้อรังซึ่งเพิ่มขึ้นมากกว่าในคนปกติ หลังจากนั้นได้มีการศึกษาอีกหลายฉบับที่รายงานออกมาตรงกันถึงระดับภูมิคุ้มกัน (antibody) ต่อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่เพิ่มมากขึ้นทั้งในซีรัม (serum) และน้ำร่องเหงือก (GCF) เพื่อให้เข้าใจในเชื้อและการก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้ดีขึ้น จึงควรทราบถึงปัจจัยก่อโรคต่างๆที่สำคัญของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ดังนี้

ฟิมเบรีย (Fimbriae)

ในการศึกษาโครงสร้างบริเวณพื้นผิวของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสพบว่าจะมีลักษณะของส่วนที่ยื่นออกไปจากพื้นผิว ซึ่งเรียกว่าฟิมเบรีย (ภาพประกอบ2) ฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสถือว่าเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการเกาะติด โดยช่วยในการเกาะติดกับพื้นผิวของเนื้อเยื่อเหงือก

ในปีค.ศ. 1984 Yoshimura⁽³⁰⁾ และคณะได้ทำการสกัดฟิมเบรียได้สำเร็จเป็นครั้งแรกจากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ 381 โดยลักษณะของฟิมเบรียที่พบคือ เป็นสายม้วนและเป็นลักษณะเส้นเดี่ยว (curled and single-stranded filament) เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นาโนเมตร (nm) ฟิมเบรียจะมีหน่วยโปรตีนย่อยที่เรียกว่า ฟิมบรินหรือฟิมเอ (fimbillin, FimA) มีขนาดตั้งแต่ 41-49 กิโลดาลตัน (kDa) ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อ⁽³¹⁾ และมียีน (gene) ที่สร้างโปรตีนในฟิมเบรียคือ ยีนฟิมเอ (fimA gene) ลำดับการเรียงตัวของโปรตีนในฟิมเบรียมีความแตกต่างจากฟิมเบรียของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ



ภาพประกอบ 2 พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ ATCC 33277 และฟิมเบรียที่อยู่บริเวณพื้นผิว

จากการศึกษาพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสที่ไม่มีฟิมเบรียของ Hamada และคณะ⁽³²⁾ ในปี ค.ศ. 1994 พบว่าเชื้อดังกล่าวจะสูญเสียความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเนื้อเยื่อเหงือก (human gingival fibroblast) และเซลล์บุผิว (epithelial cell) นั้นแสดงถึงความสำคัญของฟิมเบรียในการเกาะติดกับเซลล์

นอกจากนั้นแล้วฟิมเบรียยังมีคุณสมบัติอื่นๆอีก เช่น กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสาร (cytokines) จากเซลล์มากขึ้น โดยพบว่าซีรัมที่ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรัง, โรคปริทันต์อักเสบรุนแรงและโรคเหงือกอักเสบ ล้วนมีภูมิคุ้มกันชนิดอิมมูโนโกลบูลินจีที่มีความจำเพาะต่อฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส (*Pg* fimbriae-specific IgG antibody) ในปริมาณสูง แต่จะพบอิมมูโนโกลบูลินเอ (IgA) และอิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (IgM) ในปริมาณต่ำ ส่วนซีรัมจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงที่พบในผู้ป่วยอายุน้อยจะพบอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมดในปริมาณต่ำ⁽²²⁾

ฟิมเบรียมีความสำคัญในการเกาะติดของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสต่อสารภายในช่องปาก (oral substrate) และโมเลกุลต่างๆ ซึ่งรวมถึงโปรลีน-ริช โปรตีน (proline-rich proteins; PRPs) โปรลีน-ริช ไกลโคโปรตีน (proline rich glycoproteins) สเตทเทอริน (staterin) เซลล์บุผิวช่องปาก (oral epithelial cells) แบคทีเรีย (bacteria) อื่นๆ ไฟบริโนเจน (fibrinogen) ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และแลคโตเฟอริน (lactoferrin)^(10,33-37)

จากการศึกษาพบว่าภูมิคุ้มกันจำเพาะต่อฟิมเบรียที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ (purified fimbriae) สามารถป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อปริทันต์ในสัตว์ทดลองได้⁽³⁸⁾ นอกจากนั้นการยับยั้งการทำงานของยีนควบคุมการสร้างฟิมเบรียทำให้ไม่มีการสร้างฟิมเบรีย จึงส่งผลให้เชื้อมีความสามารถในการทำให้เกิดการทำลายของกระดูกน้อยลงในสัตว์ทดลอง⁽³⁹⁾

แคปซูลาร์โพลีแซคคาไรด์ (Capsular polysaccharide)

แคปซูลของแบคทีเรียมีหน้าที่หลากหลายทั้งเป็นเสมือนเกราะป้องกันสำหรับเชื้อป้องกันการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีสมีแคปซูลในลักษณะเป็นสารเหนียวที่มีความหนาแน่น (dense and amorphous capsule) ซึ่งประกอบไปด้วยสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide heteropolymer) มีคุณสมบัติกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน แคปซูลจะประกอบไปด้วยสารประเภทกลูโคส (glucose) กลูโคซามีน (glucosamine) กาแลคโตซามีน (galactosamine) และกรดกาแลคโตสมินูโรนิก (galactosaminuronic acid) จากการศึกษาในหนูที่ได้รับการฉีดภูมิคุ้มกันต่อโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) พบว่าจะลดความรุนแรงของการติดเชื้อลงแต่ไม่สามารถป้องกันการรุกรานของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีสได้ อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะพบระดับภูมิคุ้มกันต่อแคปซูลาร์โพลีแซคคาไรด์ในระดับต่ำ ซึ่งเซลล์ภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จะเข้าจับกับส่วนโปรตีนของเซลล์ มีบางส่วนที่เข้าจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) อย่างไรก็ตามไม่พบการเข้าจับกับแคปซูลาร์โพลีแซคคาไรด์⁽²²⁾

ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinins)

กลุ่มของโปรตีน (Protein complex) บริเวณผิวเซลล์ซึ่งมีชื่อเรียกว่าฮีแมกกลูตินิน แอดฮีซิน (hemagglutinin adhesin, HA-Ag2) จัดว่าเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการเกาะติดชนิดหนึ่งเช่นเดียวกับฟิมเบรีย ฮีแมกกลูตินินจะมีความสามารถในการจับกับเม็ดเลือดแดงโดยประกอบไปด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptides) ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างน้อย 2 ชนิด บางครั้งสามารถพบได้ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนนอก (outer membrane) ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส ซึ่งจากการตรวจในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะพบว่ามีภูมิต้านทานตอบสนองต่อโพลีเปปไทด์ นั่นคือฮีแมกกลูตินินมีผลทำให้ร่างกายมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน⁽²²⁾ จากการศึกษาของ Chandad⁽⁴⁰⁾ ในปีค.ศ. 1995 พบว่ามีความเกี่ยวข้องกันเป็นอย่างมากระหว่างฟิมเบรียกับฮีแมกกลูตินิน โดยพบว่าตำแหน่งที่เข้าเกาะของฟิมเบรียและฮีแมกกลูตินินจะอยู่บนโดเมนเอฟ2เอชที่มีความจำเพาะ (specific domain F2, H) ซึ่งทั้งฟิมเบรียและฮีแมกกลูตินินจะมีความสามารถร่วมกันในการเกาะติดกับเซลล์

ฮีแมกกลูตินินจัดเป็นโปรตีน สามารถพบฮีแมกกลูตินินในพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีสได้ 5 ชนิด เมื่อปรากฏอยู่ที่ผิวเซลล์ฮีแมกกลูตินินจะช่วยในการเกาะกับพื้นผิวเซลล์โดยจะเชื่อมระหว่างเชือกกับตัวรับซึ่งเป็นสารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เนื่องจากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีสจำเป็นต้องใช้ฮีม (heme) หรือสารที่มีธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบในการดำรงชีวิตดังนั้นมันจึงจับกับเม็ดเลือดแดงเพื่อประโยชน์ในด้านเป็นแหล่งอาหาร⁽²⁹⁾

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS)

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีสมีไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างไปจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ของแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ โดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालีส

จะไม่มีสารบางชนิด (heptose, 2-keto-3-deoxyoctonate) จึงส่งผลให้มีความเป็นพิษที่ต่ำเมื่อนำมาวิเคราะห์แต่ยังสามารถกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ จากการศึกษาของ Ishikawa และคณะ⁽²²⁾ ในปี ค.ศ. 1997 พบว่าระดับภูมิคุ้มกันต่อไลโปโพลีแซคคาไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสมีความสัมพันธ์กับโรคปริทันต์อักเสบที่เป็นเฉพาะที่ในผู้ป่วยอายุน้อย (localized juvenile periodontitis) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาของ Ekuni และคณะ⁽⁴¹⁾ ในปีค.ศ. 1991 พบว่าไลโปโพลีแซคคาไรด์จะมีผลทำให้เกิดการเคลื่อนลงสู่ปลายราก (apical migration) ของเยื่อบุผิวเชื่อมต่อและเกิดการยื่นยาวของเรเทริดจ์ (rete ridge) อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบบีเซลล์ (B cells) เป็นจำนวนมาก พบการละลายของกระดูกและการฉีกขาดในชั้นเยื่อบุผิว (intraepithelial cleavage) ในสัตว์ทดลอง

เอนไซม์ (Enzymes)

พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้หลายชนิด⁽²⁸⁾ ซึ่งเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) และเอนไซม์โปรตีเอสที่คล้ายทริปซิน (trypsin-like protease) จะถือว่าเป็นเอนไซม์ที่เด่นของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส ซึ่งทำให้สามารถแยกพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสออกจากแบคทีเรียในกลุ่มสร้างเม็ดสีดำและไม่ใช่ออกซิเจนอื่นๆได้ง่ายยิ่งขึ้น⁽²²⁾

คอลลาจีเนสของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสจะเป็นเอนไซม์ชนิดขึ้นอยู่กับไทออล (thiol dependent) ซึ่งต้องการไอออนของโลหะ (metal ion) ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอส (protease) อื่นๆ ในการย่อยสลายเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ยีนที่รับผิดชอบในการสร้างคอลลาจีเนส คือ ยีนพีอาร์ทีซี (prtC) ในการวิเคราะห์คอลลาจีเนสด้วยวิธีเอสดีเอสโพลีอคริลไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) จะพบว่าคอลลาจีเนสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35 กิโลดาลตัน (kDa)⁽²²⁾

ส่วนเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายทริปซิน (trypsin-like enzyme) นั้นเป็นโปรตีเอสชนิดหนึ่งของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นประเภทโปรตีนและเปปไทด์ เช่นเดียวกับทริปซิน (trypsin) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่จะไม่ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งทริปซิน (soy-bean trypsin inhibitor)

จากการศึกษาของ Ootogoto & Karamitsu⁽⁴²⁾ ในปีค.ศ. 1993 ได้พบยีนพีอาร์ทีที (prtT gene) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตโปรตีเอสที่มีน้ำหนัก 53 กิโลดาลตัน จัดเป็นเอนไซม์ชนิดขึ้นกับไทออล (thiol dependent) การทำงานนั้นจะไปลดระดับการทำงานของพีอาร์ทีซี ต่อมาในภายหลังพบว่ายีนชนิดนี้ยังมีส่วนในการผลิตซิสเทอีนโปรตีเอส (cysteine pretease) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 96-99 กิโลดาลตันอีกด้วย⁽²²⁾

จิงจีเพน (Gingipain) เป็นเอนไซม์ของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสอีกชนิดหนึ่งซึ่งถูกรายงานครั้งแรกว่าเป็นซิสเทอีนโปรตีเอสที่มีน้ำหนัก 50 กิโลดาลตัน มีลักษณะสำคัญ 3 อย่างที่แตกต่างออกไปจากซิสเทอีนโปรตีเอสปกติทั่วไป คือ เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายเอไมด์ด้วยไดเปปไทด์ที่มีไกลซีนเป็นส่วนประกอบ (glycine-containing dipeptides) มีช่วงที่แสดงความจำเพาะที่แคบซึ่งอยู่ภายในส่วนของอาร์จินิน (arginine) ที่มีพันธะเปปไทด์ (peptide bond)

เป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังเป็นเอนไซม์ที่มีความทนทานต่อตัวยับยั้งโปรตีนเนส (proteinase inhibitors) ที่มีอยู่ในพลาสมาของมนุษย์ (human plasma)⁽²²⁾

ในปีคศ. 1984 Yoshimura และคณะ⁽³⁰⁾ ได้รายงานถึงซิสเตอีนโปรตีเอสที่คล้ายกับทริปซิน (trypsin-like cysteine protease) ที่มีคุณสมบัติเหมือนอีแมกกลูติโนเจนจากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ 381 พบว่าที่ปลายเอ็น (N-terminal) จะมีความแตกต่างออกไปจากการรายงานอื่นๆ ต่อมาในปีคศ. 1994 Kadowky⁽⁴³⁾ ได้สกัดซิสเตอีนโปรตีนเนสที่จำเพาะต่ออาร์จินิน (arginine-specific cysteine proteinase) ที่มีชื่อเรียกว่า อาร์จิงจิเพน (argingipain) ซึ่งเอนไซม์ที่สกัดได้นั้นจะเป็นชนิดขึ้นอยู่กับไทออล แต่จะมีบางส่วนที่มีลักษณะของเอนไซม์ชนิดอื่น (metallo and serine endopeptidase) รวมด้วย เอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 4 (collagen type I and IV) รวมทั้งอิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) ได้อย่างรุนแรง⁽²²⁾

ต่อมาได้มีการศึกษาถึงไทออลโปรตีเอส (thiol protease) ที่มีน้ำหนัก 64 กิโลดาลตันของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ W83 ซึ่งสร้างจากยีนที่อาร์พี (*trp* gene) ซึ่งเป็นยีนที่มีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้ด้วย พบว่าในกรณีที่ยีนที่อาร์พีที่มีความผิดปกติไปจะส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อมีความผิดปกติไปด้วย

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนในซีรัม (serum protein) เช่น อิมมูโนโกลบูลินและกลุ่มของคอมพลีเมนต์ในการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในซีรัมของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส พบว่าเชื้อนี้สามารถทำให้เกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของโปรตีนหลักในซีรัม (major serum proteins) ได้ โดยเอนไซม์ที่ขึ้นกับไทออล ร่วมกับการทำงานของเอนไซม์ที่คล้ายกับทริปซิน (trypsin like activity)

สรุปได้ว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีเอนไซม์โปรตีนเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ถูกสร้างขึ้นและจะมีผลในขบวนการการรุกรานและการทำลายเนื้อเยื่อของร่างกายได้โดยตรง รวมทั้งมีผลทางอ้อมในขบวนการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย กระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารเอ็มเอ็มพี (MMPs) ส่งผลให้เกิดการทำลายเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) รวมไปถึงกระบวนการยับยั้งตัวหน่วงในพลาสมาโปรตีน (plasma protein inhibitor) การตัดออกบางส่วนของตัวรับบริเวณผิวเซลล์ (cell surface receptor) การกระตุ้นหรือยับยั้งคอมพลีเมนต์และไซโตไคน์ (complement factor and cytokine) รวมทั้งกระตุ้นกลไกบางอย่าง (kallikreinkin cascade)⁽²⁸⁾

การศึกษาทางพยาธิวิทยาของ Ekuni⁽⁴¹⁾ ในปี 2003 พบว่าในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับโปรตีเอสจะพบระยะระหว่างเซลล์ในชั้นเยื่อหุ้มมีระยะห่างมากขึ้น (enlargement of intercellular space of JE) พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโพลีมอร์โฟนิวเคลียนิวโตฟิลและการขยายตัวของหลอดเลือดเป็นจำนวนมาก การทำลายของเนื้อเยื่อและผลของการทำลายดังกล่าวจะถูกพบได้มากขึ้นในกลุ่มที่ได้รับไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ร่วมด้วย

โปรตีนแอนติเจน (Protein antigens)

โปรตีนที่อยู่ที่ย่อหุ้มเซลล์ส่วนนอก (Outer membrane protein) ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ W50 จะประกอบไปด้วยแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลหลายระดับ โดยแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 46 กิโลดาลตัน จะเป็นตัวเด่นในการตอบสนองต่อซีรัมจากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่มีระดับความรุนแรงของโรคมามาก⁽²²⁾

ระบบภูมิคุ้มกันต้านทานในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเรื้อรังจะมีการตอบสนองต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (44, 57 และ 82 กิโลดาลตัน) แต่ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบรุนแรงจะมีการตอบสนองต่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (18, 25, 27 และ 44 กิโลดาลตัน)⁽⁴⁴⁾ นอกจากนั้นในการศึกษาพบว่าโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน⁽⁴⁴⁾ และโปรตีนฟิมบริลลิน (fimbriin proteins) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกาย นั้นแสดงว่าโปรตีนแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 40-44 กิโลดาลตัน จะเป็นเป้าหมายของระบบภูมิคุ้มกันต้านทานของผู้ป่วยในโรคปริทันต์อักเสบ⁽²²⁾

กลไกการรุกรานของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสต่อโรคปริทันต์อักเสบ

ในการก่อโรคและการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบนั้นอาศัยแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีความรุนแรงในการก่อโรคได้แตกต่างกัน พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป คือ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสไม่สามารถกระตุ้นการผลิตอีซีเเล็คตินจากเซลล์บุผนังหลอดเลือดของมนุษย์ (human endothelial cell) ได้โดยตรง ส่งผลให้ลิวโคไซต์ (leukocyte) ไม่สามารถเข้าจับเซลล์บุผนังหลอดเลือดและไม่สามารถผ่านออกไปสู่ภายนอกหลอดเลือด (extravascular compartment) ได้ ซึ่งเป็นผลมาจากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสไปสกัดกั้นขั้นตอนในการตอบสนองของการอักเสบ⁽⁹⁾ นอกจากนั้นอีซีเเล็คตินยังสามารถถูกกระตุ้นทางอ้อมได้โดยไซโตไคน์ที่เอนเอฟแอลฟาและอินเตอร์ลิวคิน-1 เบตา แต่จากการศึกษาพบว่าไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ทั้ง 2 จากเซลล์เม็ดเลือดของมนุษย์ (human peripheral blood mononuclear cell) ได้ไม่ดี นอกจากนั้นยังพบอีกว่าไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะไม่ค่อยจับกับโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ (LPS binding protein) นั่นก็คือ โอกาสในการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (innate host defence) จะเป็นไปได้ยาก⁽⁹⁾ จึงไม่พบการตอบสนองของร่างกายที่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่ช่วยป้องกันการรุกรานของแบคทีเรียก่อโรคปริทันต์ จึงส่งผลให้เกิดโรคปริทันต์อักเสบได้ตามมา

จากการศึกษาอื่นๆพบว่า พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะไปยับยั้งความสามารถของแบคทีเรียอื่นในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่งอีซีเเล็คตินจากเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) นอกจากนั้นยังพบอีกว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสและไลโปโพลีแซคคาร์ไรด์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสามารถยับยั้งการหลั่งสารโปรตีนคีโมแทกซิส-1 อินเตอร์ลิวคิน-8 จากเซลล์โมโนไซต์ (monocyte chemotaxis protein-1, IL-8) และโมเลกุลใช้ในการยึดติดที่อยู่ภายในเซลล์ของเซลล์

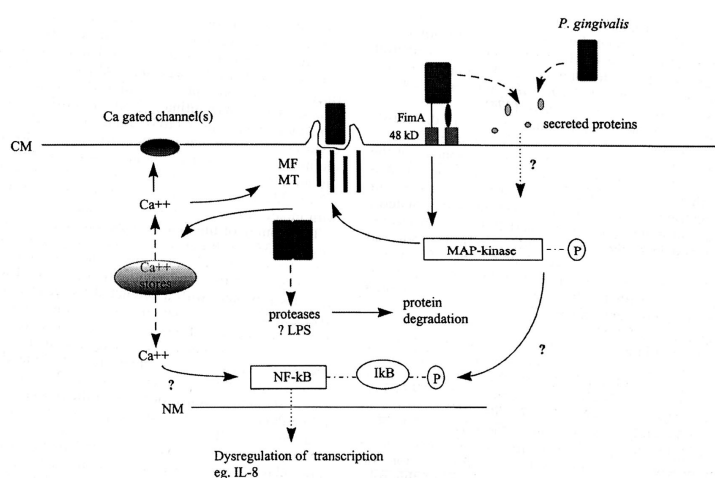
บุผนังหลอดเลือด เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเนื้อเยื่อเหงือกและเซลล์บุผิวของเนื้อเยื่อเหงือก (intracellular adhesion molecule of human endothelial cell, gingival fibroblast and gingival epithelial cell) ⁽⁹⁾ พอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสจะสามารถยับยั้งการอักเสบซึ่งเป็นการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านต่อแบคทีเรียได้ ภาวะดังกล่าวจะได้มาจากการความสามารถของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสที่ช่วยให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมและเอื้อต่อการจับติดและเติบโตของคราบแบคทีเรียใต้เหงือก (subgingival plaque biofilm) ในบริเวณที่มีการเจริญเติบโตของคราบแบคทีเรีย พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสจะเป็นหนึ่งในแบคทีเรียกลุ่มนั้น

ภายหลังจากที่แบคทีเรียมีการสะสมและรวมกลุ่มกันอย่างเหมาะสมบนผิวฟันแล้ว เชื้อเหล่านั้นจะมีการเพิ่มจำนวนและมีการรุกรานผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อของร่างกายบริเวณเยื่อบุผิวเชื่อมต่อของเหงือก (gingival junctional epithelium) ⁽⁴⁵⁾ แบคทีเรียบางชนิดเมื่อรุกรานเข้าสู่ชั้นเยื่อบุผิวแล้วจะกระตุ้นให้มีการตอบสนองจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้เกิดการทำลายชั้นเยื่อบุผิวตามมา ในขณะที่พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสจะเป็นเชื้อที่สามารถผ่านชั้นเยื่อบุผิวไปได้ ^(9,28,33,46) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการแทรกตัวไปในชั้นเยื่อบุผิวของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส นั้น เกิดจากการที่เชื้อสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตัวรับบนผิวเซลล์ (cell surface receptor) หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในขบวนการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (intracellular signaling pathways)

นอกจากนี้ในการศึกษาเรื่องการแทรกตัวของเชื้อเข้าสู่ภายในเซลล์บุผิวนั้น ^(21,46-47) พบว่ามีการศึกษากับเซลล์ 2 ชนิด คือ การศึกษาในเซลล์เยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือก (primary cultures of gingival epithelial cells; GEC) และเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่มีการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์เนื้อร้าย (transformed oral epithelial cells) เช่น เซลล์เคบี (KB cell)

มีการรายงานการศึกษาในห้องทดลองเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิส โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือกเป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1992 โดยการใช้เซลล์จากเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือกในชั้นล่างสุด (basal epithelium extracted from gingival explants) เมื่อการศึกษาเริ่มขึ้นเพียง 15 นาที หลังจากเซลล์สัมผัสกับพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสจะพบว่าเกิดการรุกรานของเชื้อเข้าสู่ภายในเซลล์ โดยพบเชื้ออยู่บริเวณรอบๆนิวเคลียสเป็นส่วนใหญ่ (perinuclear area) เชื้อที่อยู่ภายในเซลล์สามารถอยู่ได้อย่างอิสระโดยไม่ถูกกักอยู่ในเยื่อหุ้ม (membrane bound vacuole) การรุกรานดังกล่าวจะเริ่มจากเชื้อมีการปล่อยโปรตีนภายนอกเซลล์ (extracellular protein) ออกมาซึ่งจะรวมถึงเอนไซม์ฟอสโฟเซอรีนฟอสฟาเตส (phosphoserine phosphatase) และเอนไซม์ที่ช่วยในการสังเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide biosynthesis enzyme) ในอีกทางหนึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวเซลล์ในส่วนที่เป็นสารคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และขัดขวางกระบวนการส่งสัญญาณที่ต้องอาศัยปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟต (phosphorylation-dependent signaling pathway) เชื้อต้องการการสัมผัสและเข้าใกล้เซลล์มากยิ่งขึ้น ในขั้นตอนนี้สิ่งสำคัญก็คือ การเข้าจับของส่วนที่เป็นเมเจอร์ฟิมเบรีย (major fimbriae) กับส่วนที่เป็นตัวรับ (receptor) ซึ่งก็คืออินทิกรินชนิดเบตาหนึ่ง (primarily β_1 integrin) หลังจากการเข้าจับของฟิมเบรีย

กับตัวรับจะพบว่าจะไปลดระดับการส่งสัญญาณ เช่น การเติมหมู่ฟอสเฟตของแพกซิลลิน (phosphorylation of paxillin) หลังจากที่เราเชื่อว่าการรุกรานมากขึ้นเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อภาวะนั้นๆ ซึ่งรวมถึงทูบูลและฟิลาเมนต์ขนาดเล็กต่างๆ (microtubule and microfilament) ในการรุกรานเข้าสู่เซลล์นั้นระดับแคลเซียมไอออน (calcium ion) เป็นสิ่งหนึ่งที่สำคัญและเชื่อจะทำให้เกิดการเพิ่มระดับของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ซึ่งระดับของแคลเซียมไอออนที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดความผิดปกติของการทรานส์คริปชัน (dysregulation of transcription) (ภาพประกอบ3) นอกจากนั้นพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะเข้าไปมีส่วนร่วมกับการบวนการของเซลล์ (mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway) ซึ่งเป็นศูนย์กลางการตอบสนองต่อสัญญาณต่างๆ ของเซลล์ ส่วนอีกกระบวนการหนึ่งซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณภายนอกเซลล์ (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2) ก็จะถูกลดระดับลงเช่นกันภายหลังการเข้าสู่เซลล์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในทางกลับกันจะพบว่าการรุกรานของเชื้อจะมีการกระตุ้นให้มีการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ปลายเอ็น (c-Jun N-terminal kinase; JNK) ซึ่งการรุกรานเข้าสู่เซลล์ของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสนั้น พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณต่างๆ ของเซลล์แม้ว่าสัญญาณนั้นจะไม่ได้เกี่ยวข้องกับการรุกรานของเชื้อเลยก็ตาม (21,28)



CM - cytoplasmic membrane

MF - actin microfilament

MT - tubulin microtubule

NM - nuclear membrane

P - phosphate

→ pathway
→ translocation
 ----→ release
 -.-.-.- reversible association

ภาพประกอบ3 การรุกรานของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสู่เซลล์บุผิวเนื้อเยื่อเหงือก

ส่วนการรุกรานเข้าสู่เซลล์เนื้อร้าย เช่น เซลล์เคบี จะมีบางส่วนที่คล้ายกับเซลล์เยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือก (GEC) ในขณะที่มีการสัมผัสกันเชื่อจะมีการกระตุ้นให้มีการหลั่งโปรตีนออกมาเพื่อให้เซลล์มีการโอบล้อมเชื่อโดยกระบวนการจะอาศัยการกระตุ้นจากตัวรับให้มีการโอบล้อมสู่ภายในเซลล์ (classic receptor-mediated endocytosis) ทำให้เชื่อเข้าสู่เซลล์ จึงสามารถพบเชื่อได้ทั้งอยู่อย่างอิสระในไซโตพลาสซึม (free in cytoplasm) และถูกหุ้มด้วยเยื่อภายในเซลล์ (within membrane bound vacuole) ในการเข้าเกาะครั้งแรกจะอาศัยเมเจอร์ฟิมเบรีย (major fimbriae) อย่างไรก็ตามในการจับกับเซลล์เคบี ก็ยังต้องอาศัยซิสเตอีนโปรตีเอส (cysteine protease) ด้วยภายหลังที่เชื่อเข้าสู่เซลล์แล้วเชื่อจะถูกพบอยู่รอบ ๆ นิวเคลียสและเซลล์เองก็จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อให้เหมาะสมกับภาวะที่เปลี่ยนไปเช่นกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการรุกรานเข้าสู่เซลล์ของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิส นั้น จะขึ้นอยู่กับตัวรับที่ผิวเซลล์และกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์

พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสยังสามารถรุกรานสู่หัวใจและเซลล์ผนังหลอดเลือดหัวใจด้วยในการเกาะติดครั้งแรกจะอาศัยเมเจอร์ฟิมเบรียซึ่งยังต้องอาศัยแอดฮีซิน (adhesin) และอินเวซิน (invasin) เช่นเดียวกับเซลล์อื่นๆ ภายหลังการรุกรานของเชื่อเข้าสู่เซลล์ เซลล์บุผนังหลอดเลือดจะมีการจัดเรียงตัวของฟิลาเมนต์และทิวบูลขนาดเล็ก (microfilament, microtubule) เมื่อเข้าสู่ภายในของเซลล์ เชื่อจะถูกหุ้มด้วยเยื่อ (membrane) หลายชั้นในลักษณะของถุงหุ้ม (vacuole) เมื่อรุกรานเซลล์บุผนังหลอดเลือด พอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสจะไปทำลายกระบวนการทำลายตัวเอง (autophagolytic pathway) และเผยแพร่กระบวนการภายในเซลล์ (endocytic pathway) สู่ไลโซโซม (lysosome) ขั้นตอนเหล่านี้ไม่เพียงแต่ช่วยให้เชื่อแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่ได้ แต่ยังทำให้ระบบของร่างกายเสียหายไปด้วย⁽²¹⁾

จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงดังที่กล่าวมาพบว่า การรุกรานของเชื่อจะมีประสิทธิภาพในเซลล์เยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อเหงือกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากกว่าในเซลล์เนื้อร้าย⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾ เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของตัวรับบนผิวเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงของสัญญาณภายในเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการรุกรานของเชื่อ การรุกรานเข้าสู่ชั้นเยื่อบุผิวของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสนั้นจะอาศัยการกระตุ้นเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ให้เกิดการยุบตัวและโอบล้อมเชื่อ (invagination) ในที่สุดพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสก็สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์ได้สำเร็จ^(46,48) หลังจากแทรกเข้าไปในเซลล์แล้วพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสจะไปอาศัยอยู่ที่ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เกิดการเพิ่มระดับของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+} ion) ภายในเซลล์⁽²⁸⁾ อย่างไรก็ตามเมเจอร์ฟิมเบรียมีความเกี่ยวข้องกับการเกาะติดกับเซลล์บุผิวรวมถึงการส่งสัญญาณเพื่อรุกรานเข้าสู่ภายในของเซลล์^(21,33) เชื่อที่เข้าสู่ภายในเซลล์จะมีการทำลายส่วนประกอบภายในเซลล์ เช่น แพกซิลลิน (paxillin) และเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการยึดติด (focal adhesion kinase; FAK) ซึ่งถือเป็นโมเลกุลที่ส่งสัญญาณควบคุมการเกาะติด การดำรงชีวิต การเจริญเติบโต การแบ่งตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์⁽⁴⁹⁾

ผลดังกล่าวจากแบคทีเรียจะเป็นผลมาจากจิงจีเพน (gingipain) และฟิมเบรีย จากการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 มีความสามารถในการทำลายทั้งแพกซิลลินและส่วนที่

ทำหน้าที่ในการยึดติดของเซลล์ได้รวดเร็วกว่าฟิมเบรียชนิดอื่นๆ ซึ่งจะมีผลยับยั้งขบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ที่เกิดขึ้นโดยโมเลกุลดังกล่าว⁽⁴⁹⁾

ในการรุกรานของเชื้อสเตรปโตคอคคัสนั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส จากการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าในพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่มีความผิดปกติของฟิมเบรียจะมีการรุกรานเข้าสู่เซลล์บุผิวได้น้อยกว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่พบลักษณะของฟิมเบรียปกติ⁽³³⁾ ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากการเข้าเกาะของฟิมเบรียกับตัวรับ (receptor) ที่ไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดการส่งสัญญาณออกไปกระตุ้นให้เกิดการโอปัลมพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสและนำเชื้อเข้าสู่ภายในเซลล์ที่มีความผิดปกติไป⁽³³⁾ นอกจากนั้นแล้วเมื่อเชื้อมีการเกาะติดเซลล์บุผิว เชื้อเองยังมีการหลั่งสารโปรตีนออกมาซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายอื่นๆต่อไป

นอกจากฟิมเบรียสามารถจับและรุกรานเซลล์เยื่อบุผิว (human epithelial cell line) แล้วฟิมเบรียยังสามารถเข้าจับและรุกรานเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือก (human gingival fibroblast) ได้อีกด้วย⁽⁵⁰⁾

ฟิมเบรีย (Fimbriae)

ฟิมเบรียและชนิดของฟิมเบรีย

จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง⁽⁵¹⁾ พบว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดที่ไม่รุนแรงและชนิดที่มีความรุนแรง⁽⁵¹⁻⁵²⁾ โดยความแตกต่างดังกล่าวนี้ไม่สามารถบอกถึงปัจจัยที่ทำให้พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสแสดงออกได้อย่างชัดเจนแต่สามารถบอกได้ว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์ที่มีแคปซูล (capsule) จะมีความรุนแรงและสามารถรุกรานเนื้อเยื่อได้มากกว่าชนิดที่ไม่มีแคปซูล (capsule) เมื่อศึกษาถึงสายพันธุ์ต่างๆของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อดังกล่าวออกได้ถึง 100 สายพันธุ์ตามลักษณะการศึกษา⁽²⁵⁻²⁷⁾ หรือสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ถึง 23 หรือ 45 กลุ่ม ตามการศึกษาโดยวิธีอาร์บิทารีไพรม์โพลีเมอร์เรสเซนซ์แอคชัน (arbitrary primed polymerase chain reaction)⁽⁵⁴⁾ ซึ่งขึ้นอยู่กับไพรม์ (primer) ที่เลือกใช้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะมีหลายสายพันธุ์ แต่ในการติดเชื้อพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในแต่ละคนจะพบความหลากหลายสายพันธุ์ได้น้อย นั่นก็คือจะพบการติดเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้นในผู้ป่วยแต่ละราย⁽⁸⁾

เมเจอร์ฟิมเบรีย (Major fimbriae of *P.gingivalis*)

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีปัจจัยก่อโรคหลายอย่างหนึ่งในนั้นก็คือฟิมเบรีย เมเจอร์ฟิมเบรีย (major fimbriae) เป็นตัวก่อโรคที่สำคัญและส่งผลต่อการเกิดและดำเนินไปของโรคปริทันต์⁽⁴⁹⁾ เมเจอร์ฟิมเบรียมีลักษณะเป็นสายอยู่บนผิวของเชื้อซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน มีความสามารถในการกระตุ้นเซลล์เจ้าบ้านรวมทั้งสามารถช่วยจับและเกาะติดอยู่ที่เซลล์เป้าหมาย ในการจับกับ

เซลล์เป้าหมายดังกล่าวจะทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์อื่นๆให้เกิดการหลั่งสารต่างๆออกมา⁽²⁸⁾ ดังนั้น เมเจอร์ฟิมเบรียจึงมีส่วนสำคัญในการรุกรานเซลล์เจ้าบ้านของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส^(33,50)

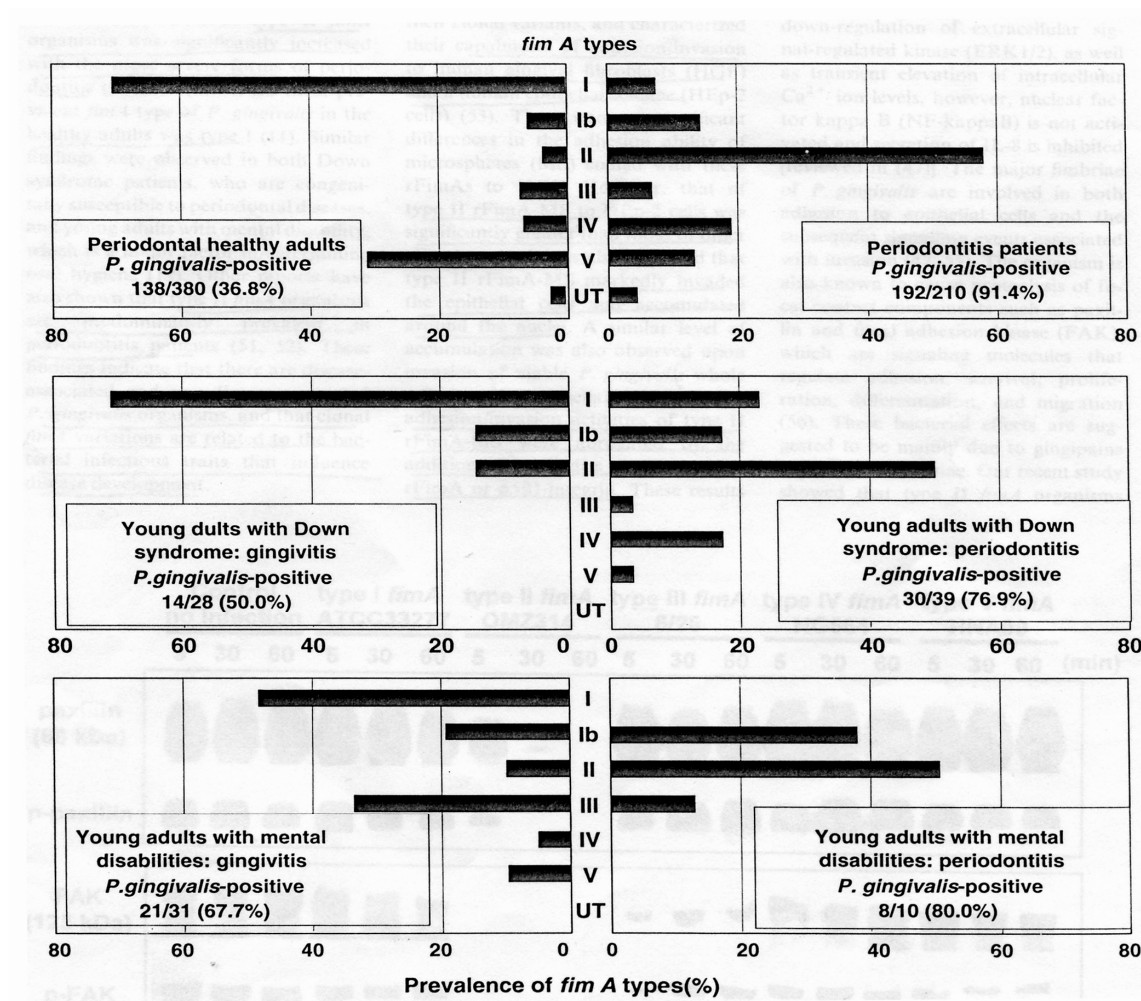
ชนิดของเมเจอร์ฟิมเบรียกับความรุนแรงของเชื้อ

ความแตกต่างของเมเจอร์ฟิมเบรียแต่ละชนิดและลักษณะของยีนควบคุมการสร้างฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสแต่ละสายพันธุ์ได้ถูกนำมาหาความสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อในการก่อให้เกิดโรค จากการศึกษาความแตกต่างของโปรตีนในฟิมเบรียได้มีการแบ่งชนิดของฟิมเบรียออกเป็น 4 กลุ่มตามลักษณะลำดับกรดอะมิโนที่ปลายเอ็น (N-terminal amino acid sequence)⁽³¹⁾ หลังจากนั้นในการศึกษาในเวลาต่อมาพบว่าสามารถแบ่งยีนควบคุมการสร้างฟิมเบรียออกได้เป็น 6 กลุ่ม ตามลักษณะของลำดับการจัดเรียงนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence)^(6,53-54) ตามกลุ่มลักษณะของฟิมเบรียที่ได้แยกออกมานั้นพบว่ากลุ่มที่มีความรุนแรงและมีการรุกรานเนื้อเยื่อนั้นได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกลุ่มที่มีฟิมเบรียชนิดที่ 2 และชนิดที่ 4 ในทางกลับกันพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่พบว่าไม่มีความรุนแรงหรือรุนแรงน้อยได้แก่ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่มีฟิมเบรียชนิดที่ 1^(6,49)

จากการศึกษาสัตว์ในทดลองพบว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่มีฟิมเบรียชนิดที่ 2 นั้นเป็นเชื้อกลุ่มที่สำคัญต่อระดับความเข้มข้นของกรดไซอะลิกในซีรัม (serum sialic acid) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับการอักเสบส่วนในกลุ่มอื่นๆที่พบว่ามีระดับของความสามารถในการก่อโรคที่มีความรุนแรงน้อยลงได้แก่ กลุ่มฟิมเบรียชนิด 1 บี ชนิดที่ 4 และ 5 (type Ib, IV, V) ตามลำดับ ในขณะที่ฟิมเบรียชนิดที่ 1 และ 3 (type I and III) มีผลต่อการตอบสนองของร่างกายน้อยที่สุด นอกจากนั้นในเชื้อกลุ่มที่มีฟิมเบรียชนิดที่ 2 พบว่าหากมีความผิดปกติของฟิมเบรีย เชื้อจะสูญเสียความสามารถในการก่อโรคไป⁽⁴⁹⁾

ชนิดของฟิมเบรียที่ตรวจพบกับลักษณะของเนื้อเยื่อปรีทันต์

ในการศึกษาถึงชนิดของฟิมเบรียด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR technique) โดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ พบว่าสามารถแบ่งฟิมเบรียออกได้เป็น 6 กลุ่ม^(6,53-54) โดยพบว่าในผู้ป่วยโรคปรีทันต์จะพบฟิมเบรียชนิดที่ 2 ได้มากที่สุด รองลงมาคือฟิมเบรียชนิดที่ 4 นอกจากนั้นยังพบอีกว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 จะถูกพบได้มากขึ้นในรอยโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้นเช่นกัน⁽⁶⁾ ในทางกลับกัน ในคนที่ไม่เป็นโรคปรีทันต์จะพบฟิมเบรียชนิดที่ 1 ได้มากที่สุด ในการศึกษาอื่นๆก็พบในลักษณะเดียวกันคือ ฟิมเบรียชนิดที่ 2 เป็นลักษณะที่สำคัญของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่พบได้ในผู้ป่วยโรคปรีทันต์อักเสบ⁽⁷⁻⁸⁾ จึงกล่าวได้ว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสและชนิดของฟิมเบรียมีความสำคัญต่อการก่อโรคและดำเนินไปของโรคปรีทันต์ (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ4 ความชุกของฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิสตามชนิดของฟิมเบรียที่พบในผู้ป่วยโรคปริทันต์

ไมเนอร์ฟิมเบรีย (Minor fimbriae of *P. gingivalis*)

เมเจอร์ฟิมเบรียได้ถูกศึกษาครั้งแรกโดย Yoshimura และคณะ⁽³⁰⁾ ในปีคศ. 1984 จากนั้นในปีคศ. 1996 ได้มีการกล่าวถึงไมเนอร์ฟิมเบรีย (minor fimbriae) ซึ่งจะมีขนาดเล็กกว่าเมเจอร์ฟิมเบรียที่ถูกค้นพบไปก่อนหน้านี้ โดยยีนที่ควบคุมการสร้างไมเนอร์ฟิมเบรีย คือ ยีนเอ็มเอฟเอ-1 (*Mfa1*) นอกจากไมเนอร์ฟิมเบรียจะแตกต่างจากเมเจอร์ฟิมเบรียที่ขนาดแล้วยังพบความแตกต่างในการกระตุ้นการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย⁽⁴⁹⁾ ในฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจีวาลิสที่มีความผิดปกติของเมเจอร์ฟิมเบรียจะมีความสามารถในการเกาะติดลดลงเป็นอย่างมากทั้งการเกาะติดกับผิวฟันและการเกาะติดกับเซลล์ต่างๆ (saliva-coated hydroxyapatite, gingival epithelial cell, fibroblast) และส่งผลให้เกิดการละลายของกระดูกลดลง ในขณะที่เดียวกันก็พบว่าไมเนอร์ฟิมเบรียสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารไซโตไคน์จากเซลล์ (IL-1 α , IL-1 β , IL-6,

TNF- α) ดังนั้นไมเนอร์ฟิมเบรียจึงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ส่งเสริมความรุนแรงของเชื้อในการทำลายเนื้อเยื่อเช่นกัน⁽⁴⁹⁾

ในการศึกษาถึงเมเจอร์และไมเนอร์ฟิมเบรียต่อความรุนแรงของเชื้อในสัตว์ทดลองที่เป็นหนู พบว่าในเชื้อประเภทที่มีความรุนแรงจะมีผลทำให้เกิดการละลายของกระดูก แต่ผลดังกล่าวจะถูกยับยั้งเมื่อเชื้อไม่มีฟิมเบรียหรือมีความผิดปกติของฟิมเบรียทั้ง 2 ประเภท ในหนูตัวที่ได้รับเชื้อที่ไม่มีเมเจอร์ฟิมเบรียจะพบว่าเกิดการละลายของกระดูกมากกว่าหนูตัวที่ได้รับเชื้อที่ไม่มีไมเนอร์ฟิมเบรียในการศึกษาถึงการเกาะติดกับเซลล์อื่นๆพบว่าในเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคจะสามารถจับติดกับเคบีเซลล์ได้ โดยในเชื้อที่ไม่มีไมเนอร์ฟิมเบรียสามารถจับติดได้มากกว่าเชื้อที่ไม่มีเมเจอร์ฟิมเบรีย แต่เชื้อที่ไม่มีทั้งเมเจอร์และไมเนอร์ฟิมเบรียจะพบว่าสูญเสียความสามารถในการจับติดกับเซลล์อื่นไป ผลจากการศึกษาที่กล่าวมาจะพบว่ายังไม่สามารถสรุปความรุนแรงหรืออิทธิพลของไมเนอร์ฟิมเบรียต่อการก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามสิ่งที่สามารถกล่าวได้ก็คือ ทั้งเมเจอร์และไมเนอร์ฟิมเบรียมีความสำคัญต่อการก่อโรคของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส⁽⁴⁹⁾

ความหลากหลายของไมเนอร์ฟิมเบรีย

แม้ว่าจะมีการศึกษาถึงความหลากหลายของยีนควบคุมการสร้างไมเนอร์ฟิมเบรียมาแล้วแต่พบว่ามีความแตกต่างของลำดับการเรียงตัวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากการศึกษาพบว่าโมเลกุลของไมเนอร์ฟิมเบรียมีความเหมือนกับส่วนประกอบต่างๆของแบคทีเรีย เช่น เมมเบรนโปรตีนส่วนนอกที่มีน้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน (75 kDa outer membrane protein)⁽⁴⁹⁾ ในพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส สายพันธุ์ 381 พบโปรตีนของไมเนอร์ฟิมเบรียที่มีน้ำหนักโมเลกุล 53 กิโลดาลตัน มีความคล้ายกับไมเนอร์ฟิมเบรียจากอีกการศึกษาหนึ่งซึ่งถูกระบุว่าเป็นเมมเบรนโปรตีนส่วนนอกที่มีน้ำหนักโมเลกุล 53 กิโลดาลตัน (53 kDa major outer membrane protein)⁽⁵⁵⁾ แม้ว่าไมเนอร์ฟิมเบรียทั้ง 2 ชนิดจะมีลักษณะที่คล้ายกัน มีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากัน แต่ไมเนอร์ฟิมเบรียทั้ง 2 ชนิด มีการกระตุ้นการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่ต่างกัน⁽⁴⁹⁾ ดังที่กล่าวมาจะพบว่าการศึกษเกี่ยวกับไมเนอร์ฟิมเบรียในเรื่องของความแตกต่างของชนิดและความสัมพันธ์กับความรุนแรงของเชื้อของยังคงไม่ได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

ผลต่อการสลายตัวของกระดูก

ดังนั้นจากที่ได้กล่าวมาแล้วจึงสรุปได้ว่าฟิมเบรียเป็นหนึ่งในส่วนสำคัญของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในการติดเชื้อในระยะแรก โดยเฉพาะระยะที่เชื้อจะทำการรุกรานเข้าสู่เซลล์บุผิวร่องเหงือก ซึ่งฟิมเบรียจะส่งผลให้เกิดการเกาะติดของเชื้อและเชื้อสามารถรุกรานเข้าสู่ภายในของชั้นเซลล์บุผิวได้ต่อไป เมื่อพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิवालิสรุกรานเข้าสู่เนื้อเยื่อแล้วจะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อตามมารวมทั้งเกิดการทำลายกระดูกด้วย พบว่าพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจะทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกรอบๆซี่ฟัน โดยกระตุ้นให้เกิดการละลายตัวของกระดูกมากขึ้น ทำให้เซลล์

ของร่างกายหลังสารบางชนิดออกมาส่งผลให้เกิดการทำลายกระดูกมากยิ่งขึ้น รวมทั้งยับยั้งการสร้างกระดูก⁽⁵⁾ ส่วนฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสพบว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการละลายของกระดูกได้เช่นกัน^(28,52) จากการศึกษาในห้องทดลอง⁽⁵⁶⁾ พบว่าฟิมเบรียมีส่วนทำให้เกิดการกระตุ้นและการหลั่งของสารต่างๆ (IL-1 β , TNF- α) จากเซลล์ของร่างกาย (monocyte, macrophage, gingival fibroblast) นอกจากนั้นยังกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของสารบางชนิด (IL-1 β , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) จากเซลล์กระดูก (bone cell)⁽²¹⁾ (ตาราง1)

ตาราง1 สารที่ถูกหลั่งมาจากเซลล์ต่างๆเมื่อได้รับการกระตุ้นจากพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส และปัจจัยก่อโรคของเชื้อ

Inducer	Cell(s) of origin	Cytokine	Pro- or anti-inflammatory action ^b
<i>P. gingivalis</i> LPS	Fibroblasts	IL-1 α	+
		IL-1 β	+
		IL-6	+
		IL-8	+
		MCP-1	+
	Monocytes/macrophages	IL-1 β	+
		TNF- α	+
		IL-1ra ^c	-
		IL-6	+
		IL-8	+
		GM-CSF ^c	+
		IFN- γ	+
	PMNs	TNF α	+
		IL-8	+
		IL-1ra	-
<i>P. gingivalis</i> lipid A-associated proteins	Fibroblasts	IL-6	+
<i>P. gingivalis</i> fimbriae	Fibroblasts	IL-1 β	+
		IL-1 α	+
	Monocytes/macrophages	IL-1 β	+
		TNF- α	+
		IL-6	+
		IL-8	+
		KC ^c	+
	Calvarial bone cells	IL-1 β	+
		GM-CSF	+
	PMNs	IL-6	+
	T cells	IL-2	+
		IL-4	-
		TNF- α	+
		IFN- γ ^c	+
<i>P. gingivalis</i> 75-kDa surface protein	Monocytes/macrophages	IL-1	+
<i>P. gingivalis</i> 12-kDa antigen	Monocytes/macrophages	IL-1 β	+
<i>P. gingivalis</i> PS	Monocytes/macrophages	IL-1 β	+
<i>P. gingivalis</i> whole cells	PMNs	IL-8	+
		MCP-1	+

^b +, proinflammatory action; -, anti-inflammatory action.

^c IL-1ra, IL-1 receptor antagonist; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; KC, neutrophil chemoattractant killer cells; IFN- γ , gamma interferon.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การกำหนดประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง
2. ขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัย
3. การจัดกระทำและวิเคราะห์ข้อมูล

การกำหนดประชากรและการเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ประชากร

ผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาทางทันตกรรม

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

ผู้ป่วยที่เข้าหลักเกณฑ์ ดังนี้

1. เข้าหลักเกณฑ์ของโรคปริทันต์อักเสบ (chronic periodontitis of AAP 1999)
2. ผู้ป่วยมีจำนวนฟันในปากอย่างน้อย 15 ซี่
3. ผู้ป่วยไม่มีโรคทางระบบใดๆ
4. ผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาทางปริทันต์รวมทั้งการขูดหินน้ำลาย และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะก่อนหน้าเข้ารับการรักษาเป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน
5. ไม่ได้อยู่ในช่วงของการรักษาโดยการจัดฟัน
6. ไม่อยู่ในช่วงของการตั้งครรภ์

ขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัย

การวิจัยครั้งนี้แบ่งการปฏิบัติงานออกเป็น 5 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จากกลุ่มตัวอย่างและการบันทึกค่าทางคลินิก
2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากคราบจุลินทรีย์
3. การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์
 - การตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
 - การวิเคราะห์ชนิดฟิล์มเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
4. การวิเคราะห์ชนิดฟิล์มเบรียโดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

5. ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR products) โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

การเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จากกลุ่มตัวอย่าง

อุปกรณ์และสารที่ใช้

1. สำลีหรือผ้าก๊อซ
2. เหล็กคีบ (forceps)
3. แท่งกระดาษปราศจากเชื้อ (sterile paperpoint)
4. หลอดพลาสติกปราศจากเชื้อที่มีฝาปิด (sterile tube)
5. สารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ (lysis buffer; SDS 0.0025%)
6. โพรบสำหรับวัดร่องลึกปริทันต์ (periodontal probe; UNC-15)

ขั้นตอน

1. การวิจัยครั้งนี้แบ่งระดับความลึกของร่องเหงือกที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จากผู้ป่วยในกลุ่มศึกษาออกเป็น 3 ระดับคือ ระดับความลึกของร่องเหงือก 1-3 มิลลิเมตร ระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตร และระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ที่มากกว่า 5 มิลลิเมตร
2. ในการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์จากผู้ป่วยกลุ่มควบคุมจะทำการเก็บจากร่องเหงือกที่มีความลึก 1-3 มิลลิเมตร
3. แต่ละระดับความลึกจะถูกเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างไม่เกิน 2 ตำแหน่ง โดยแต่ละตำแหน่งจะต้องไม่อยู่ในซี่ฟันที่ติดกัน
4. ใช้ผ้าก๊อซกั้นน้ำลายบริเวณด้านข้างซี่ฟันที่ต้องการเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง
5. ใช้สำลีเช็ดทำความสะอาดคราบจุลินทรีย์เหนือเหงือก (supragingival plaque) บนซี่ฟันที่ต้องการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก (subgingival plaque)
6. ทำการวัดร่องลึกปริทันต์ในตำแหน่งที่จะทำการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือก (subgingival plaque)
7. สอดแท่งกระดาษ (sterile paperpoint) ลงไปในร่องลึกปริทันต์จนสุดความลึกร่องลึกปริทันต์ ทิ้งแท่งกระดาษไว้ในร่องลึกปริทันต์ 10 วินาที
8. นำแท่งกระดาษออกจากร่องลึกปริทันต์ จากนั้นนำไปใส่ในหลอดพลาสติก (sterile tube) ที่บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ไมโครลิตร (50 ul of lysis buffer; SDS 0.0025%)
9. บันทึกข้อมูลต่างๆลงในแบบบันทึก

การบันทึกค่าทางคลินิก

1. การวัดความลึกของร่องเหงือก (หรือร่องลึกปริทันต์) ทำการวัดโดยใช้โพรบสำหรับวัดร่องลึกปริทันต์สอดลงไปจนสุดร่องเหงือก บันทึกค่าความลึกระยะจากขอบเหงือกจนถึงจุดต่ำสุดเป็นมิลลิเมตร

2. การวัดค่าระดับการยึดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ในคลินิก วัดโดยใช้โพรบสำหรับวัดร่องลึกปริทันต์วัดจากรอยต่อของเคลือบฟันและเคลือบรากฟัน (cemento-enamel junction; CEJ) จนถึงจุดลึกสุดของร่องเหงือกเป็นมิลลิเมตร

3. ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือก ตามเกณฑ์ของ Loe ⁽⁵⁷⁾ ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

0 – เหงือกปกติ

1 – เหงือกมีการอักเสบเล็กน้อย สีเหงือกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (แดงมากขึ้น) มีลักษณะบวมเล็กน้อย ไม่พบเลือดออกภายหลังการร่องเหงือกวัดด้วยโพรบ

2 – เหงือกมีการอักเสบมากขึ้น เหงือกมีสีแดงและมีลักษณะบวม จุดผิวสัมผัสบนเหงือกหายไปพบเลือดออกภายหลังการร่องเหงือกวัดด้วยโพรบ

3 – เหงือกมีการอักเสบมาก เหงือกมีสีแดงจัดและบวมมากขึ้นอาจพบรอยถลอกบนเนื้อเยื่อเหงือก พบเลือดออกได้ง่าย

4. ดัชนีวัดการโยกของฟัน – ตามเกณฑ์ของ Miller ⁽⁵⁸⁾ ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

N – ฟันโยกได้เล็กน้อยเป็นปกติ

1 – ฟันโยกเล็กน้อย โดยโยก 1 มิลลิเมตร ในแนวด้านแก้ม-ด้านลิ้น

2 – ฟันโยกปานกลาง โดยโยกมากกว่า 1 มิลลิเมตร ในแนวด้านแก้ม-ด้านลิ้น

3 – ฟันโยกมาก โดยโยกมากกว่า 1 มิลลิเมตร ทั้งในแนวด้านแก้ม-ด้านลิ้นและในแนวตั้ง

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) จากคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง

อุปกรณ์และสารที่ใช้

1. หลอดพลาสติกมีฝาปิดที่บรรจุสารละลายไลซิสบัฟเฟอร์ และแท่งกระดาษที่ทำกรเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์

2. เครื่องเพิ่มอุณหภูมิ น้ำ (waterbath)

3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

ขั้นตอน

1. นำคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกที่เก็บจากร่องลึกปริทันต์ (บรรจุอยู่ใน lysis buffer) มาใช้ในการวิจัย

2. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที

3. นำหลอดที่มีสารละลายดังกล่าวไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4. ดูดสารละลายใสขึ้นมาเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป (ดีเอ็นเอจะถูกสกัดออกมาอยู่ในส่วนใสของสารละลายดังกล่าว)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์

อุปกรณ์และสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดพลาสติกขนาดเล็ก (mini-microcentrifuge)
2. เครื่องพีซีอาร์ (PCR machine)
3. ปิเปตอัตโนมัติ (autopipette)
4. หลอดพลาสติกขนาดเล็ก (microcentrifuge tubes) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
5. ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA)
6. เอนไซม์แทคทีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (5u/ul *Taq* DNA polymerase)
7. สารละลายแทคบัฟเฟอร์ (10x *Taq* Buffer with KCl; 100mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 C), 500mM KCl, 0.8% Nonidet P40)
8. สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25mM $MgCl_2$)
9. สารละลายดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (2mM dNTP mix deoxynucleotide triphosphate mixs; dNTPs)
10. ไพรเมอร์
 - ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน 16 เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (specific primers for *Porphyromonas gingivalis* 16S-rRNA; forward and reverse primers)⁽¹⁸⁾ สำหรับการตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
 - ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนฟิมเบรียแต่ละชนิด (specific primers for *fimA* genotypes; forward and reverse primer) สำหรับการวิเคราะห์ชนิดฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (ตาราง2)
11. น้ำกลั่น (sterile distilled water)

ตาราง2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อฟิมเบรียชนิดที่ 1-5^(6,53)

ชนิดฟิมเบรีย	ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ (5' - 3')	รีเวอร์สไพรเมอร์ (5' - 3')
I	CTGTGTGTTTATGGAACTTC	AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA
II	ACAACTATACTTATGACAATGG	AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA
III	ATTACACCTACACAGGTGAGGC	AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA
IV	CTATTCAGGTGCTATTACCCAA	AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA
V	AACAACAGTCTCCTTGACAGTG	TATTGGGGGTCGAACGTTACTGTC

การตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

ขั้นตอน

- เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสำหรับผสมสารหลัก (master mix) โดยผสมสารต่างๆ ลงในหลอดให้มีความเข้มข้นดังต่อไปนี้
 - 0.2 ไมโครโมลาร์ (uM) ของไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน 16 เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส
 - 0.625 หน่วย (Unit) ของเอ็นไซม์แทคตีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส
 - 1x สารละลายบัฟเฟอร์
 - 0.2 มิลลิโมลาร์ (mM) ของสารละลายดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต
 - 1.5 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์
 - น้ำกลั่น
- เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด บันทึกที่ฝาหลอดเป็นหมายเลข 1, 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นเติมสารที่เตรียมจากข้อ 1. ลงในแต่ละหลอดให้ได้ปริมาตร 23 ไมโครลิตร และเติมสารต่างๆลงในหลอดทดลองดังนี้
 - หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร (ตัวควบคุมบวก)
 - หลอดที่ 2 เติมน้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร (ตัวควบคุมลบ)
 - หลอดที่ 3 เติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร
- ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน และรวบรวมสารไว้กันหลอดโดยปั่นที่ความเร็วประมาณ 1000xg ประมาณ 3 วินาที
- นำหลอดทดลองใส่ในเครื่องพีซีอาร์ปิดฝาเครื่องและตั้งรอบกระบวนการพีซีอาร์ดังนี้
 - ก่อนสลายสายดีเอ็นเอ (Pre-denaturation) 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
 - จากนั้นจึงให้เครื่องทำงานต่ออีก 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบการทำงานประกอบไปด้วย
 - สลายสายดีเอ็นเอ (Denaturing) 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 - เชื่อมสายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ (Annealing) 56 องศาเซลเซียส 1 นาที
 - เพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอ (Extension) 72 องศาเซลเซียส 2 นาที
 - เพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอสุดท้าย (Final-extension) 72 องศาเซลเซียส 10 นาที
- เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์สิ้นสุดแล้ว เติมน้ำย้อม (6x loading dye; 0.25% bromophenol blue, 25% glycerol, 60 mM EDTA, pH 8.0) จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
- เมื่อทราบผลการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในตัวอย่างที่ทำการเก็บแล้ว นำตัวอย่างดังกล่าวไปทำการตรวจสอบชนิดของพืชมะเขือในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ชนิดฟิล์มเบรียของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวาลิส

ขั้นตอน

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เตรียมสารหลัก โดยผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังต่อไปนี้

- 0.4 ไมโครโมลาร์ ของไพโรเมอร์ที่จำเพาะต่อฟิล์มเบรียแต่ละชนิด
- 1 หน่วยของเอ็นไซม์แทคทีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส
- 1x สารละลายบัฟเฟอร์
- 0.2 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต
- 1.5 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์
- น้ำกลั่น

2. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เขียนที่ฝาหลอดเป็นหมายเลข 1-2 จากนั้นเติมสารที่เตรียมจากข้อ 1. ลงในแต่ละหลอดให้ได้ปริมาตร 23 ไมโครลิตร และเติมสารต่างๆลงในหลอดทดลองดังนี้

หลอดที่ 1 เติมดีเอ็นเอของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิวาลิสสายพันธ์มาตรฐาน 2 ไมโครลิตร (ตัวควบคุมบวก)

หลอดที่ 2 เติมน้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร (ตัวควบคุมลบ)

หลอดที่ 3 เติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร (ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจพบยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของพอร์โรโมนเนส จิงจิวาลิส)

3. ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน และรวบรวมสารไว้กันหลอดโดยปั่นที่ความเร็วประมาณ 1000xg ประมาณ 3 วินาที

4. นำหลอดทดลองใส่ในเครื่องพีซีอาร์ ปิดฝาเครื่องและตั้งโปรแกรมดังต่อไปนี้

- | | |
|---|---------------------------------|
| ก่อนสลายสายดีเอ็นเอ | 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที |
| จากนั้นจึงให้เครื่องทำงานต่ออีก 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบการทำงานประกอบไปด้วย | |
| สลายสายดีเอ็นเอ | 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที |
| เชื่อมสายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ | 53 องศาเซลเซียส 1 นาที |
| เพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอ | 72 องศาเซลเซียส 2 นาที |
| เพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอสุดท้าย ที่ | 72 องศาเซลเซียส 10 นาที |

5. เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์สิ้นสุดแล้ว เติมสีย้อม (6x loading dye; 0.25% bromophenol blue, 25% glycerol, 60 mM EDTA, pH 8.0) จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จำนวน 8 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ชนิดพืชมเบรียโดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

สารที่ใช้เพิ่มเติมในการศึกษาด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนพืชมเบรียร่วมกับการตัดผลิตภัณฑ์อย่างจำเพาะด้วยเอนไซม์เฮ3

1. ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนพืชมเบรีย (Universal Pg fimA primer; Uf primer)
2. เอนไซม์เฮ3 (10u/ul HaeIII)
3. สารละลายบัฟเฟอร์อาร์ (10mM Tris-HCL (pH 8.5), 10mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 0.1mg/ml BSA)

ขั้นตอน

1. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อใช้เตรียมสารหลัก โดยผสมสารต่างๆ ลงในหลอดตามตารางดังต่อไปนี้

- 0.4 ไมโครโมลาร์ ของไพรเมอร์ที่มีจำเพาะต่อเชื้อพืชมเบรียแต่ละชนิด
- 1 หน่วยของเอนไซม์แทคตีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส
- 1x สารละลายบัฟเฟอร์
- 0.2 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต
- 1.5 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์
- น้ำกลั่น

2. เตรียมหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด เขียนที่ฝาหลอดเป็นหมายเลข 1-2 จากนั้นเติมสารที่เตรียมจากข้อ 1. ลงในแต่ละหลอดให้ได้ปริมาตร 23 ไมโครลิตร และเติมสารต่างๆลงในหลอดทดลองดังนี้

หลอดที่ 1 เติมดีเอ็นเอของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐาน 2 ไมโครลิตร (ตัวควบคุมบวก)

หลอดที่ 2 เติมน้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร (ตัวควบคุมลบ)

หลอดที่ 3 เติมสารละลายที่มีดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร (ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจพบยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของพอร์โรโมแนส จิงจิवालิส)

3. ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน และรวบรวมสารไว้กันหลอดโดยปั่นที่ความเร็วประมาณ 1000xg ประมาณ 3 วินาที

4. นำหลอดทดลองใส่ในเครื่องพีซีอาร์ ปิดฝาเครื่องและตั้งโปรแกรมดังต่อไปนี้

- | | |
|---|---------------------------------|
| ก่อนสลายสายดีเอ็นเอ | 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที |
| จากนั้นจึงให้เครื่องทำงานต่ออีก 30 รอบ ซึ่งแต่ละรอบการทำงานประกอบไปด้วย | |
| สลายสายดีเอ็นเอ | 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที |
| เชื่อมสายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ | 53 องศาเซลเซียส 1 นาที |
| เพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอ | 72 องศาเซลเซียส 2 นาที |
| เพิ่มความยาวสายดีเอ็นเอสุดท้าย ที่ | 72 องศาเซลเซียส 10 นาที |

5. เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์สิ้นสุดแล้ว เติมสีย้อม (6x loading dye; 0.25% bromophenol blue, 25% glycerol, 60 mM EDTA, pH 8.0) จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จำนวน 8 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

6. นำตัวอย่างที่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1220 คู่เบส ไปตัดด้วยเอนไซม์เฮ3 โดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากยูนิเวอร์แซลไพร์เมอร์สำหรับยีนพิมเบรีย 15 ไมโครลิตร เข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3 5 หน่วย และสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1x จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้เข้าอบ (incubate) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารย้อมสี (6x loading dye) 5 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสม นำส่วนผสมที่ได้ไปตรวจสอบหาดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

ตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

อุปกรณ์และสารที่ใช้

1. ขวดรูปชมพู่
2. เครื่องเพิ่มอุณหภูมิน้ำ
3. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)
4. หวี (comb) สำหรับทำช่องใส่สาร
5. ถาดสำหรับใส่เจล
6. เครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอเลต (UV)
7. อุปกรณ์ถ่ายภาพ
8. ผงอะกาโรส
9. สารละลายบัฟเฟอร์ (1X TBE buffer)
10. ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์
11. โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)
12. เอธิดียมโรไมด์ (ethidium bromide)
13. ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้บอกขนาดดีเอ็นเอที่ตรวจสอบ (100 bp ladder DNA)

ขั้นตอน

1. ชั่งผงอะกาโรส จำนวน 1.5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่
2. จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (Tris-acetate-EDTA buffer) ให้ได้ปริมาตร 100

มิลลิลิตร

3. ละลายผงอะกาโรสโดยเพิ่มความร้อนบนเครื่องเพิ่มอุณหภูมิ นำออกมาเขย่าทุก ๆ 30 วินาที จนได้สารละลายเจล วางไว้ให้เย็นประมาณ 50 องศาเซลเซียส

4. เตรียมถาดสำหรับเทเจลโดยปิดส่วนหัวและท้ายถาดด้วยเทปกาว และวางหวีลงบนถาดเจลปรับระดับความลึกให้พอเหมาะ

5. เทเจลที่อุ่นลงบนถาด กำจัดฟองอากาศออกด้วยปิเปต วางเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แข็งตัว (ประมาณ 15-30 นาที)

6. หลังจากเจลแข็งตัว ดึงหัวและเทปกาวที่ปิดส่วนหัวและทำยอก เทสารละลายบัฟเฟอร์ (1x TBE buffer) ให้ท่วมเจลเล็กน้อย (1-2 มิลลิเมตร)

7. เตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.5x marker) โดยเตรียมในหลอด 2 มิลลิตร ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder DNA) 25 ไมโครลิตร สีย้อม (dye) 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 15 ไมโครลิตร

8. จากนั้นหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.5x marker) ที่เตรียมลงในช่องของเจล

9. ใส่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 8 ไมโครลิตร ที่ผสมกับสีย้อม (loading dye) 2 ไมโครลิตร ลงในช่องของเจล ปิดฝาของเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis chamber) และต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

10. ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีระดับที่เหมาะสม (~ 5 โวลต์/ซม.) ประมาณ 100 โวลต์ รอจนกระทั่งสีของโบรมอฟินอลบลู (bromophenol blue) เคลื่อนที่ใกล้ส่วนท้ายเจล ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ประมาณ 10 นาที นำเจลไปล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ดูขนาดของชิ้นดีเอ็นเอและเก็บภาพด้วยชุดถ่ายภาพ

11. เทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่พบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้บอกขนาด (marker) เพื่อเปรียบเทียบขนาดโมเลกุล โดย

พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส มีขนาดประมาณ 404 คู่เบส (bp)

ฟิมเบรียชนิดที่ 1 มีขนาดประมาณ 392 คู่เบส

ฟิมเบรียชนิดที่ 2 มีขนาดประมาณ 257 คู่เบส

ฟิมเบรียชนิดที่ 3 มีขนาดประมาณ 247 คู่เบส

ฟิมเบรียชนิดที่ 4 มีขนาดประมาณ 251 คู่เบส

ฟิมเบรียชนิดที่ 5 มีขนาดประมาณ 462 คู่เบส

12. ตัวอย่างใดที่พบทั้งฟิมเบรียชนิดที่ 1 และฟิมเบรียชนิดที่ 2 พิจารณานำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์นั้นมาศึกษาต่อโดยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ (restriction analysis) ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์อาร์ชาวัน (Rsa I) ไปทำการตัดลำดับเบสบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์อย่างจำเพาะ โดยเอนไซม์อาร์ชาวันจะมีผลต่อสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิด 1 ปี (type Ib *fimA*)

13. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 12 มาทำการวิเคราะห์ต่อยด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ถ้าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นฟิมเบรียชนิด 1 ปี จะพบแถบดีเอ็นเอบนเจลจำนวน 2 แถบ ได้แก่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 162 และ 109 คู่เบส⁽⁵⁴⁾

การจัดกระทำและวิเคราะห์ข้อมูล

1. บันทึกการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสและชนิดของฟิมเบรียที่พบในคราบจุลินทรีย์ ตัวอย่าง

2. หาความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับความลึกของร่องลึกปริทันต์ที่ตรวจพบจากทางคลินิก โดยใช้สถิติในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์

3. หาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดฟิมเบรียที่ตรวจพบกับความลึกของร่องลึกปริทันต์ที่ตรวจพบจากทางคลินิก โดยใช้สถิติในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. แสดงผลเชิงพรรณนาลักษณะของประชากร เพศ อายุ ค่าทางคลินิก ได้แก่ ความลึกของร่องเหงือก ค่าการยืดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกรวมทั้งดัชนีวัดการโยกของฟันและแสดงค่าความถี่ของการตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสและชนิดของฟิมเบรีย

2. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับภาวะการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยใช้สถิติ Chi-Square Test

3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับค่าทางคลินิก ได้แก่ ระดับความลึกของร่องเหงือก ระดับค่าการยืดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและดัชนีวัดการโยกของฟัน ในระดับตำแหน่งของกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยใช้สถิติ Chi-Square Test

4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับความลึกของร่องเหงือกและค่าการยืดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U Test และแสดงผลด้วยแผนภาพแบบ Box Plot

5. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของฟิมเบรียที่พบกับค่าทางคลินิก ได้แก่ ระดับความลึกของร่องเหงือก ระดับค่าการยืดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและดัชนีวัดการโยกของฟัน โดยใช้สถิติ Chi-Square Test

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ข้อมูลทางคลินิก

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกจากผู้ป่วยทั้งสิ้น 48 ราย เป็นผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 14 ราย และผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 34 ราย ผู้ป่วยเพศชายมีทั้งสิ้น 23 ราย (47.92%) แบ่งเป็นผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 3 ราย และผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 20 ราย ส่วนผู้ป่วยเพศหญิง 25 ราย (52.08%) แบ่งเป็นผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 11 ราย และผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 14 ราย ผู้ป่วยทั้งหมดมีอายุเฉลี่ย 47.35 ± 12.64 ปี โดยอายุเฉลี่ยในกลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเท่ากับ 45.64 ± 13.05 ปี และกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเท่ากับ 48.06 ± 12.60 ปี ช่วงอายุของผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 22-66 ปี และ 22-73 ปี ตามลำดับ (ตาราง3)

ตาราง3 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่ร่วมในการศึกษาครั้งนี้

		กลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ	กลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบ	รวม
ชาย	จำนวน	3	20	23
	ร้อยละ	21.43	58.82	47.92
หญิง	จำนวน	11	14	25
	ร้อยละ	78.57	41.18	52.08
อายุเฉลี่ย (ปี)		45.64 ± 13.05	48.06 ± 12.60	47.35 ± 12.64
ประวัติการสูบบุหรี่ (มวนต่อวัน)	> 10	0	10	10
	< 10	1	3	4
	ไม่สูบ	13	21	34
ประวัติการดื่มแอลกอฮอล์	ดื่ม	3	14	17
	ไม่ดื่ม	11	20	31

ประวัติการสูบบุหรี่และการดื่มสุรา (ตาราง3) ในกลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีผู้ป่วยที่สูบบุหรี่ 1 ราย ซึ่งสูบน้อยกว่า 10 มวนต่อวัน และดื่มสุรา 3 ราย โดยในผู้ป่วยที่สูบบุหรี่มีประวัติการดื่มสุราด้วย ส่วนในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมีผู้ป่วยสูบบุหรี่มากกว่า 10 มวนต่อวันจำนวน 10 ราย สูบน้อยกว่า 10 มวนต่อวัน 3 ราย และดื่มสุรา 14 ราย (ผู้ป่วยสูบบุหรี่น้อยกว่า 10 มวนต่อวันและมีประวัติดื่มสุรา 3 ราย ผู้ป่วยสูบบุหรี่น้อยกว่า 10 มวนต่อวันและมีประวัติดื่มสุรา 8 ราย)

ตาราง4 ภาวะทางคลินิกที่ตรวจพบในตำแหน่งที่ทำการเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง

		กลุ่มไม่เป็น โรคปริทันต์ อักเสบ	กลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบ			รวม
			ตำแหน่งไม่พบ ร่องลึกปริทันต์ (1-3 มม.)	ร่องลึกปริทันต์ ระดับปานกลาง (4-5 มม.)	ร่องลึกปริทันต์ ระดับรุนแรง (> 5 มม.)	
ตำแหน่งที่	จำนวน	28	52	60	46	186
เก็บตัวอย่าง	ร้อยละ	15.05	27.96	32.23	24.73	100
ความลึกร่องเหงือกเฉลี่ย (มิลลิเมตร)		2.71 ± 0.46	2.90 ± 0.30	4.63 ± 0.49	6.89 ± 1.10	
ค่าการยืดเกาะทางคลินิก เฉลี่ย (มิลลิเมตร)		3.46 ± 0.79	3.40 ± 0.66	5.67 ± 0.95	8.15 ± 1.28	
ดัชนีการอักเสบ ของเหงือก		1.36 ± 0.49	2.08 ± 0.62	2.35 ± 0.52	2.67 ± 0.47	
ดัชนีระดับ การโยกของฟัน		0	0.096 ± 0.30	0.32 ± 0.47	0.98 ± 0.65	

จากตาราง4 เป็นข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษารั้งนี้ คราบจุลินทรีย์ตัวอย่างจากร่องเหงือกและร่องลึกปริทันต์ทั้งสิ้นจำนวน 186 ตัวอย่าง ถูกเก็บจากผู้ป่วย 48 ราย ผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 14 ราย จะถูกเก็บคราบจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 28 ตัวอย่าง และใน

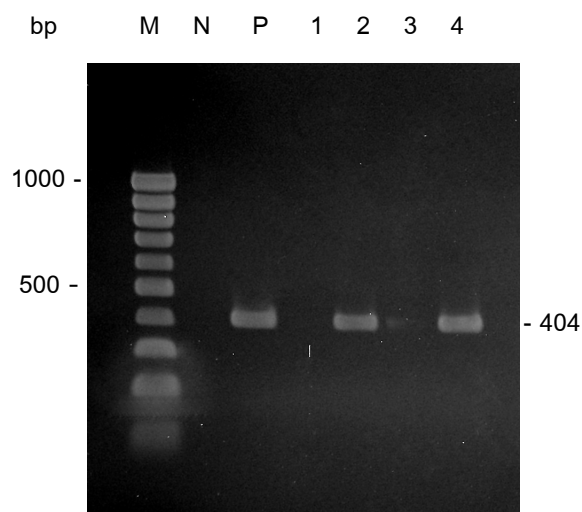
ผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 34 ราย จะถูกเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างจำนวน 158 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นตำแหน่งที่ไม่พบร่องลึกปริทันต์ (1-3 มิลลิเมตร) 52 ตัวอย่าง ตำแหน่งที่มีระดับร่องลึกปริทันต์ปานกลาง (4-5 มิลลิเมตร) 60 ตัวอย่าง และตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์รุนแรง (ตั้งแต่ 6 มิลลิเมตร) 46 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางคลินิกในตำแหน่งที่ถูกเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างตามลักษณะที่ได้ทำการศึกษา (4 กลุ่ม ตามลักษณะความรุนแรงจากน้อยไปมาก) แบ่งออกเป็นตำแหน่งที่เก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ตำแหน่งที่เก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างในบริเวณที่ไม่พบร่องลึกปริทันต์ ในบริเวณที่พบร่องลึกปริทันต์ปานกลาง และในบริเวณที่พบร่องลึกปริทันต์รุนแรงจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ พบว่าค่าเฉลี่ยความลึกร่องเหงือกและร่องลึกปริทันต์ของทั้ง 4 กลุ่มสอดคล้องกับความรุนแรงทางคลินิก คือ 2.71 ± 0.46 , 2.90 ± 0.30 , 4.63 ± 0.49 และ 6.89 ± 1.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่าการยืดเกาะของเนื้อเยื่อปริทันต์ทางคลินิกโดยเฉลี่ยจะพบว่ามีค่าเท่ากับ 3.46 ± 0.79 , 3.40 ± 0.66 , 5.67 ± 0.95 และ 8.15 ± 1.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนลักษณะทางคลินิกอื่นๆที่ตรวจได้แก่ ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและดัชนีวัดการโยกของฟัน พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกับความรุนแรงที่ตรวจพบตามกลุ่มการศึกษา โดยมีความรุนแรงน้อยไปสู่ความรุนแรงที่มากขึ้น (ตาราง4)

การตรวจหาพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากคราบจุลินทรีย์

ข้อมูลส่วนต่อมาจะเป็นการสรุปถึงการตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยการตรวจพบเชื่อดังกล่าวเป็นการตรวจพบยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของเชื้อจากคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ (ภาพประกอบ5) จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 404 คู่เบส เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่พบไปทำการเปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC33277 จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 404 คู่เบสเช่นเดียวกัน ในขณะที่ตัวควบคุมลบไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใดๆ

เมื่อพิจารณาจากผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้ 3 รายจาก 14 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 21.43 ในขณะที่ผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะสามารถพบได้ 30 รายจาก ผู้ป่วย 34 รายหรือคิดเป็นร้อยละ 88.24

เมื่อพิจารณาตามลักษณะทางคลินิกของตำแหน่งที่ได้ทำการเก็บคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างพบว่าในกลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส ในคราบจุลินทรีย์ได้ 5 ตัวอย่างจากคราบจุลินทรีย์ 28 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 17.86 ในส่วนของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะแบ่งออกตามตำแหน่งที่ทำการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ออกเป็นตำแหน่งที่ไม่มีร่องลึกปริทันต์ ตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ปานกลาง และตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์รุนแรง พบว่าสามารถตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้ คิดเป็นร้อยละ 61.54 (พบ 32 จากคราบจุลินทรีย์ 52 ตัวอย่าง) ร้อยละ 76.67 (46 จาก 60 ตัวอย่าง) และร้อยละ 91.30 (42 จาก 46 ตัวอย่าง) ตามลำดับ (ตาราง5)



ภาพประกอบ5 การพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากวิธีพีซีอาร์โดยไพรเมอร์ 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ

แถว M : 100 bp DNA ladder

แถว N : ตัวควบคุมลบ

แถว P : ตัวควบคุมบวก

แถว 1-4 : แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ตาราง5 จำนวนตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากวิธีพีซีอาร์โดยตรวจพบยีน16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอของเชื้อ

		กลุ่มไม่เป็นโรค ปรีทันต์อีกเสบ		กลุ่มที่เป็นโรคปรีทันต์อีกเสบ		
		ผู้ป่วย	ตำแหน่ง	ผู้ป่วย	ตำแหน่งไม่พบ ร่องลึกปรีทันต์ (1-3 มม.)	ร่องลึกปรีทันต์ ระดับปานกลาง (4-5 มม.)
						ร่องลึกปรีทันต์ ระดับรุนแรง (> 5 มม.)
จำนวน		14	28	34	52	60
พบเชื้อ	จำนวน	3	5	30	32	46
	ร้อยละ	21.43	17.86	88.24	61.54	76.67
						91.30

120/158 (75.95%)

88/106 (83.02%)

จากข้อมูลในตาราง5 พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากคราบจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 125 ตัวอย่าง โดยพบในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 5 ตัวอย่าง และในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 120 ตัวอย่าง

ดังนั้นจากการตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจากคราบจุลินทรีย์ทั้งในระดับบุคคลและระดับตำแหน่งจะพบว่า ในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะมีโอกาสพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับภาวะการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

จากข้อมูลผลการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่าในคราบจุลินทรีย์ที่ได้ทำการเก็บจากกลุ่มผู้ป่วยทั้งหมดจำนวน 48 ราย สามารถตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้ในผู้ป่วย 33 ราย โดยพบจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 30 ราย และพบจากผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 3 ราย เมื่อพิจารณาในระดับบุคคลถึงความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับภาวะการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยใช้สถิติ Chi-Square Test พบว่าได้ค่าไคสแควร์เท่ากับ 23.351 และค่าทางสถิติ (p) น้อยกว่า 0.001 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีความสัมพันธ์กับภาวะการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในส่วนต่อมาเมื่อพิจารณาในระดับตำแหน่งถึงความสัมพันธ์ในการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสระหว่างกลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบกับกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบที่มีความลึกของร่องเหงือก 1-3 มิลลิเมตร โดยใช้สถิติ Chi-Square Test พบว่าได้ค่าไคสแควร์เท่ากับ 13.969 และค่าทางสถิติ (p) น้อยกว่า 0.001 สามารถสรุปได้ว่าที่ความลึกของร่องเหงือก 1-3 มิลลิเมตร การพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีความสัมพันธ์กับภาวะการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับค่าทางคลินิกในระดับตำแหน่งของกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับค่าทางคลินิก 4 ชนิดได้แก่ ระดับความลึกของร่องเหงือก ระดับค่าการยึดเกาะของเยื่อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือก รวมทั้งดัชนีวัดการโยกของฟัน (ตาราง6) โดยใช้สถิติ Chi-square Test ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ดังกล่าวพบว่าได้ค่าไคสแควร์เท่ากับ 10.090 และ 10.965 ได้ค่าทางสถิติ (p) เท่ากับ 0.006 และ 0.004 ในความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับ ระดับความลึกของร่องเหงือกและระดับค่าการยึดเกาะของเยื่อเยื่อปริทันต์ทางคลินิกตามลำดับ ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและดัชนีวัดการโยกของฟันพบว่าได้ค่าไคสแควร์เท่ากับ 17.205 และ 17.942 ได้ค่าทางสถิติ (p) น้อยกว่า 0.001

ของทั้งสองคู่ความสัมพันธ์ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสและค่าทางคลินิก ทั้ง 4 ชนิดได้แก่ ระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ ระดับค่าการยึดเกาะของเยื่อเยื่อปริทันต์ทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและระดับการโยกของฟันมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

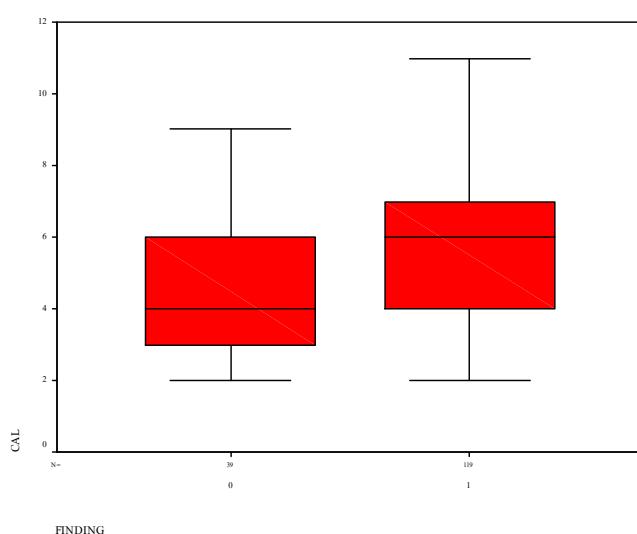
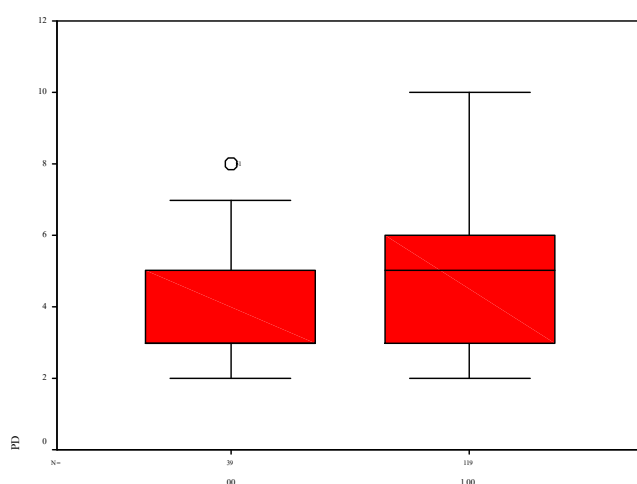
เมื่อทำการวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับประวัติการสูบบุหรี่ โดยใช้สถิติ Chi-Square Test พบว่าได้ค่าไคสแควร์เท่ากับ 2.274 และได้ค่าทางสถิติ (p) เท่ากับ 0.517 นั่นคือสามารถกล่าวได้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับประวัติการสูบบุหรี่มีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีความสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตาราง6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าทางคลินิก 4 ชนิดกับการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ

ค่าทางคลินิก		การพบเชื้อ (ตำแหน่ง)	
		ไม่พบ	พบ
ระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์ (มม.) [*]	1-3	20 (38.5%)	32 (61.5%)
	4-5	14 (23.3%)	46 (76.7%)
	> 5	5 (10.9%)	41 (89.1%)
ระดับการยึดเกาะทางคลินิก(มม.) [*]	1-3	12 (42.9%)	16 (57.1%)
	4-5	15 (31.9%)	32 (68.1%)
	> 5	12 (14.5%)	71 (85.5%)
ดัชนีการอักเสบของเหงือก [*]	1	3 (33.3%)	6 (66.7%)
	2	31 (36.9%)	53 (63.1%)
	3	5 (7.7%)	60 (92.3%)
ระดับการโยกของฟัน [*]	0	35 (36.1%)	62 (63.9%)
	1	3 (5.6%)	51 (94.4%)
	2	1 (16.7%)	5 (83.3%)
	3	0 (0)	1 (100.0%)

^{*} หมายถึง มีความสัมพันธ์กับการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อมาในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเช่นเดิม โดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าทางคลินิก 2 ค่า คือ ความลึกของร่องลึกปริทันต์และการยืดเกาะของเยื่อเยื่อปริทันต์ทางคลินิกระหว่างกลุ่มที่พบเชื้อและไม่พบเชื้อ โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U Test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าทางคลินิกทั้งสองกับการพบเชื้อและไม่พบเชื้อ โดยได้ค่าทางสถิติ (p) ระหว่างความลึกของร่องลึกปริทันต์กับการพบเชื้อเท่ากับ 0.001 และการยืดเกาะของเยื่อเยื่อปริทันต์ทางคลินิกกับการพบเชื้อ มีค่าทางสถิติ (p) น้อยกว่า 0.001 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าตำแหน่งที่พบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสจะมีค่าทางคลินิกทั้ง 2 ชนิด คือความลึกของร่องลึกปริทันต์และการยืดเกาะของเยื่อเยื่อปริทันต์ทางคลินิกมากกว่าตำแหน่งที่ตรวจไม่พบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพประกอบ 6)



PD - ความลึกร่องเหงือก (มิลลิเมตร)

CAL - ค่าการยืดเกาะทางคลินิก

FINDING - การพบเชื้อ

0 - ไม่พบเชื้อ

1 - พบเชื้อ

ภาพประกอบ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจีวาลิสกับความลึกของร่องเหงือก และค่าการยืดเกาะทางคลินิก

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียจากตัวอย่างที่พบฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

การวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียนั้นได้ใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของฟิล์มเบรียซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ตามการศึกษาของ Amano และคณะ⁽⁶⁾ ที่มีความจำเพาะต่อฟิล์มเบรียชนิดที่ 1-4 และไพรเมอร์ตามการศึกษาของ Nakagawa และคณะ⁽⁵³⁾ ที่มีความจำเพาะต่อฟิล์มเบรียชนิดที่ 5 ผลจากการศึกษาพบว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงชนิดของฟิล์มเบรียจึงไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียจากชุดไพรเมอร์ดังกล่าวได้ ทั้งในกลุ่มของผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบและผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียในครั้งนี้มีฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐานเพียง 2 สายพันธุ์ คือ ฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์ ATCC33277 และสายพันธุ์ W50 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีฟิล์มเบรียชนิดที่ 1 และ 4 ตามลำดับ ทั้ง 2 สายพันธุ์จะถูกใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) ส่วนเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานอื่นๆซึ่งเป็นตัวแทนของฟิล์มเบรียอีก 4 ชนิดที่เหลือไม่สามารถนำมาเป็นตัวควบคุมในการศึกษาครั้งนี้ได้

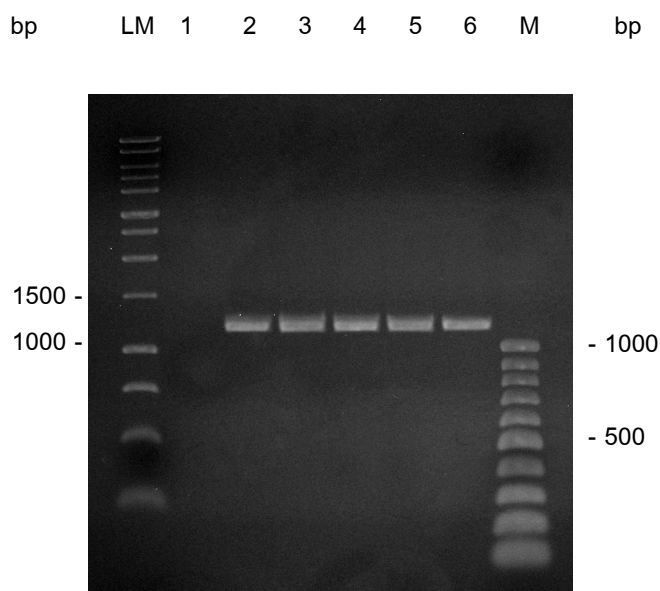
เมื่อไม่สามารถทำการวิเคราะห์ชนิดฟิล์มเบรียของฟอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของฟิล์มเบรียได้ จึงพิจารณาทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการศึกษาดังกล่าวยังคงเป็นการศึกษาที่อาศัยวิธีพีซีอาร์อยู่ แต่มีการเปลี่ยนแปลงไพรเมอร์และวิธีการวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรีย ส่วนไพรเมอร์ที่นำมาใช้จะเป็นไพรเมอร์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใหม่

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียโดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR-RFLP)

ในการวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียในขั้นตอนนี้ จะทำการศึกษาด้วยวิธีพีซีอาร์โดยการใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นมาใหม่ (ส่วนของรีเวอร์สไพรเมอร์ยังคงใช้ตามการศึกษาของ Amano⁽⁵³⁾ เช่นเดิม เนื่องจากพบว่าสามารถเข้าจับได้กับยีนฟิล์มเบรียได้ทุกชนิด) ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ได้ทำการออกแบบให้สามารถจับกับยีนฟิล์มเบรียได้ทั้ง 6 ชนิด (ชนิดที่ 1-5 และชนิด 1 ปี) จึงเรียกไพรเมอร์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นใหม่นี้ว่า “ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิล์มเบรีย” (Universal *Pg fimA* primer; *Uf* primer) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการศึกษาด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวจะมีขนาดประมาณ 1220 คู่เบส จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียในภายหลังด้วยการตัดของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งเป็นลักษณะของการศึกษาวิจัยโดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)

ในการศึกษาด้วยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิล์มเบรียนั้น ได้ทำการปรับระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ (ภาพประกอบ7) และไพรเมอร์ (ภาพประกอบ8) ให้มีความเหมาะสมเพื่อเพิ่มศักยภาพในกระบวนการพีซีอาร์ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แสดงแถบดีเอ็นเอได้

อย่างมีความชัดเจนมากที่สุด โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์และยูนิเวอร์แซลไพร์เมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียคือ 1.5 มิลลิโมลาร์ และ 0.4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

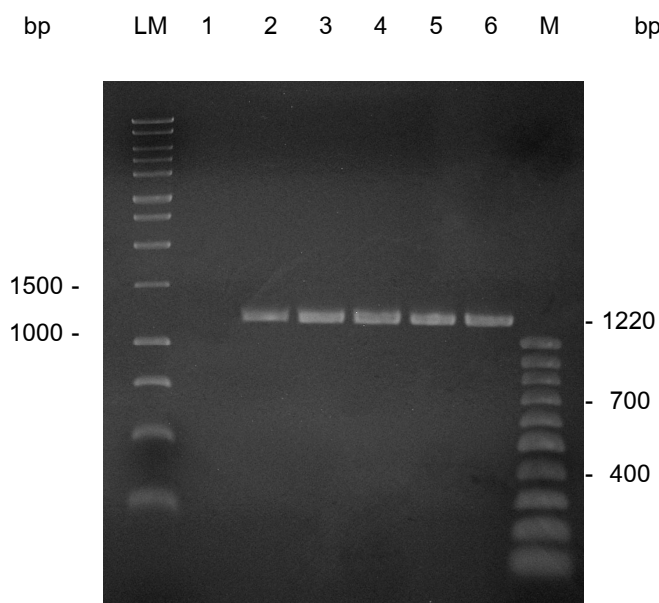


ภาพประกอบ 7 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมกนีเซียมคลอไรด์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ยูนิเวอร์แซลไพร์เมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย

แถว LM : 1000 bp DNA ladder

แถว M : 100 bp DNA ladder

แถว 1-6 : แถบตีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แสดงความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ



ภาพประกอบ 8 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยูนิเวอร์แซลไพร์เมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

แถว LM : 1000 bp DNA ladder

แถว M : 100 bp DNA ladder

แถว 1-6 : แถวดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แสดงความเข้มข้นของไพร์เมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย

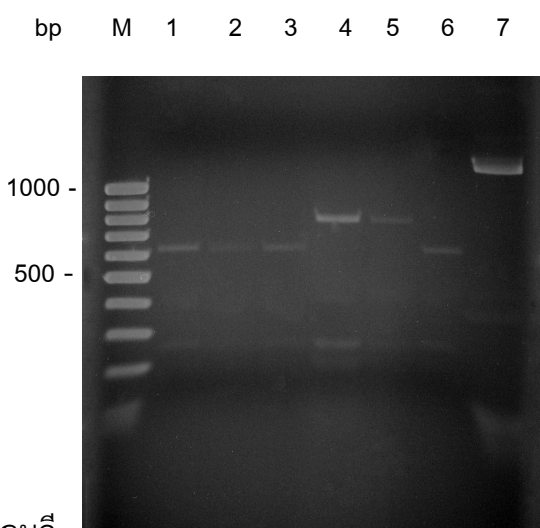
0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียด้วยการตัดของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ ในการศึกษครั้งนี้ใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะคือ เอนไซม์เฮ3 (HaeIII enzyme) เพื่อการแยกชนิดของฟิมเบรียชนิดที่ 1-5 และ 1 ปี ส่วนเอนไซม์อาร์ซา1 (RsaI enzyme) จะใช้เพื่อยืนยันดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิดที่ 5

ในการศึกษครั้งนี้ได้ใช้ยูนิเวอร์แซลไพร์เมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียในตัวอย่างที่ตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส (ยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ) ภายหลังจากไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียจากชุดไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะได้ การศึกษาโดยใช้ยูนิเวอร์แซลไพร์เมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียพบว่าสามารถตรวจพบยีนฟิมเบรียในคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบได้จำนวน 24 ตัวอย่าง จากคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสจำนวน 120 ตัวอย่าง โดยสังเกตได้ว่าไม่พบยีนฟิมเบรียในคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างที่เก็บจากผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ในตำแหน่งที่ไม่พบร่องลึกปริทันต์จะพบยีนฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 5 ตัวอย่างจาก 32 ตัวอย่าง ในตำแหน่งที่พบร่องลึกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตร และมากกว่า 5 มิลลิเมตร พบยีนฟิมเบรีย 8 ตัวอย่างจาก 46 ตัวอย่าง และ 11 ตัวอย่างจาก 42 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตาราง 7)

ตาราง 7 การพบยีนฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส โดยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

	กลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ		กลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบ			
	ผู้ป่วย	ตำแหน่ง	ผู้ป่วย	ตำแหน่งไม่พบร่องลึกปริทันต์ (1-3 มม.)	ร่องลึกปริทันต์ระดับปานกลาง (4-5 มม.)	ร่องลึกปริทันต์ระดับรุนแรง (> 5 มม.)
พบเชื้อ	3	5	30	32	46	42
พบยีนฟิมเบรีย	0	0	8	5	8	11



ภาพประกอบ 9 ภาพแถบดี

เอ็นเอของยีนฟิมเบรียชนิด 1

บีและชนิดที่ 2 หลังการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

แถว M : 100 bp DNA ladder

แถว 1 - 6 : แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังผ่านการตัดด้วยเอนไซม์เฮ3

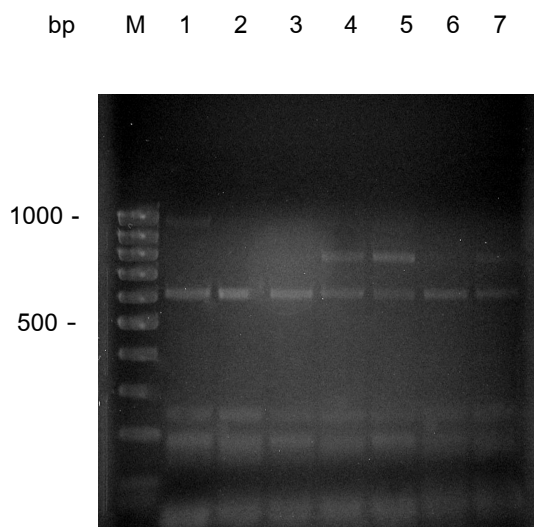
แถว 7 : แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังผ่านการตัดด้วยเอนไซม์เฮ3

เมื่อทำการวิเคราะห์ต่อมาถึงชนิดของฟิมเบรียพบว่าสามารถตรวจพบฟิมเบรียได้ 2 ชนิด คือ ฟิมเบรียชนิด 1บี (แถว 1-3 และ 6 ในภาพประกอบ9) พบในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 5 ราย โดยพบได้ทั้งในตำแหน่งไม่พบร่องลึกปริทันต์ (4 ตำแหน่ง) ตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตร (5 ตำแหน่ง) และตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์มากกว่า 5 มิลลิเมตร (5 ตำแหน่ง) ส่วนฟิมเบรียอีกชนิดที่ตรวจพบ คือ ฟิมเบรียชนิดที่ 2 (แถว 4-5 ในภาพประกอบ9) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ 2 ราย เมื่อพิจารณาตามระดับความลึกของร่องเหงือกพบว่าในตำแหน่งที่ไม่พบร่องลึกปริทันต์และตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตร จะพบฟิมเบรียชนิดที่ 2 ได้ 1 ตำแหน่ง ส่วนตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์มากกว่า 5 มิลลิเมตรจะพบฟิมเบรียชนิดที่ 2 ได้ 6 ตำแหน่ง ดังตาราง8

ตาราง8 ชนิดของฟิมเบรียที่สามารถจำแนกได้จากผู้ป่วยในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

ชนิดของฟิมเบรีย	ผู้ป่วย (ราย)	จำนวนตำแหน่งที่พบฟิมเบรีย		
		ไม่พบร่องลึกปริทันต์ (1-3 มม.)	ร่องลึกปริทันต์ระดับ ปานกลาง (4-5 มม.)	ร่องลึกปริทันต์ระดับ รุนแรง (> 5 มม.)
1	0	0	0	0
1บี	5	4	5	5
2	2	1	1	6
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
ชนิด 1บีและชนิดที่ 2	1	0	2	0
รวม	8	5	8	11

จากการพบยีนฟิมเบรียทั้ง 2 ชนิดในผู้ป่วย 7 รายนั้น พบว่าผู้ป่วยแต่ละรายจะถูกตรวจพบฟิมเบรียเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ 1 ราย ที่ถูกตรวจพบฟิมเบรียได้ 2 ชนิดจากทราบจุลินทรีย์ที่ทำการเก็บจากตำแหน่งเดียวกันในตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตร จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยพบฟิมเบรียชนิด 1บี และฟิมเบรียชนิดที่ 2 (แถว 4-5 ในภาพประกอบ10) ดังตาราง8



ภาพประกอบ 10 พบดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรีย 2 ชนิดในคราบจุลินทรีย์เดียวกันหลังการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

แถว M : 100 bp DNA ladder

แถว 1 - 7 : แถวดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หลังผ่านการตัดด้วยเอนไซม์เฮ3

การวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียจากดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอ InstaGene™ Matrix

จากการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียโดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นจะพบว่ามีตัวอย่างอีกจำนวนมากที่ไม่สามารถระบุชนิดของฟิมเบรียได้ จึงได้มีแนวคิดที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเปลี่ยนวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากคราบจุลินทรีย์ตัวอย่างโดยจะใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

ในการศึกษาเพิ่มเติมนี้ ได้รับความอนุเคราะห์ดีเอ็นเอตัวอย่างจากภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 19 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 9 ราย และผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 10 ราย ดีเอ็นเอดังกล่าวได้เคยถูกใช้ในงานวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ โดยเป็นดีเอ็นเอที่สกัดจากชุดสกัดดีเอ็นเอ InstaGene Matrix และตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสทั้ง 19 ตัวอย่าง ดีเอ็นเอทั้งหมดถูกนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดฟิมเบรีย 3 วิธีเปรียบเทียบกัน ได้แก่

วิธีที่ 1 วิเคราะห์โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดฟิมเบรียของ Amano ⁽⁶⁾ และ Nakagawa ⁽⁵³⁾ โดยวิธีพีซีอาร์

วิธีที่ 2 วิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้น โดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

วิธีที่3 วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นร่วมกับชุดโปรแกรมที่มีความจำเพาะต่อชนิดพืชมะเขี๋ยของ Amano ⁽⁶⁾ และ Nakagawa ⁽⁵³⁾ โดยวิธีพีซีอาร์

จากการวิเคราะห์ชนิดพืชมะเขี๋ยโดยวิธีที่1 สามารถวิเคราะห์ชนิดของพืชมะเขี๋ยได้เพียง 6 ตัวอย่างจาก 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 31.58) โดยวิเคราะห์ได้จากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบเท่านั้น พืชมะเขี๋ยที่พบเป็นชนิด 1ปี จำนวน 2 ตัวอย่างและชนิดที่ 4 จำนวน 4 ตัวอย่าง (ตาราง9)

แต่เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีที่2 และวิธีที่3 ได้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันมาก กล่าวคือ สามารถพบยีนพืชมะเขี๋ยจากดีเอ็นเอต้นแบบได้ 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ78.95) จากวิธีที่2 และ 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ73.68) จากวิธีที่3 และผลการวิเคราะห์ที่ตรงกันจากทั้ง 2 วิธีคือ พบพืชมะเขี๋ยชนิดที่ 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง, พืชมะเขี๋ยชนิดที่ 2 จำนวน 3 ตัวอย่าง และพบพืชมะเขี๋ยชนิดที่ 4 จำนวน 2 ตัวอย่าง จากกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ส่วนในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะพบพืชมะเขี๋ยชนิด 1ปี จำนวน 2 ตัวอย่าง และพืชมะเขี๋ยชนิดที่ 3 จำนวน 2 ตัวอย่าง ส่วนผลที่แตกต่างกันคือ วิธีที่2 พบพืชมะเขี๋ยชนิดที่ 4 จำนวน 4 ตัวอย่าง แต่วิธีที่3 พบพืชมะเขี๋ยชนิดที่ 4 จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตาราง 9)

ตาราง 9 ชนิดของฟิล์มเบรียที่พบจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอ InstaGene Matrix

		ชนิดของฟิล์มเบรียที่พบจากไพรเมอร์ต่างๆ		
ดีเอ็นเอต้นแบบ		ชุดไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อ ชนิดของฟิล์มเบรีย	ไพรเมอร์สำหรับ ยีนฟิล์มเบรีย + เอนไซม์เฮ3	ไพรเมอร์สำหรับ ยีนฟิล์มเบรีย + ไพรเมอร์จำเพาะ ต่อชนิดฟิล์มเบรีย
Positive control	ATCC33277	1	1	1
	W50	4	4	4
Negative control		0	0	0
	H1	0	1	1
	H2	0	0	0
	H3	0	0	0
	H4	0	2	2
	H5	0	1	1
	H6	0	2	2
	H7	0	2	2
	H8	0	4	4
	H9	0	4	4
	P1	0	3	3
	P2	4	4	4
	P3	0	3	3
	P4	1b	1b	1b
	P5	4	4	4
	P6	1b	1b	1b
	P7	4	4	4
	P8	4	4	0
	P9	0	0	0
	P10	0	0	0
ร้อยละของการพบ		6/19 = 31.38	15/19 = 78.95	14/19 = 73.68

Positive control : ตัวอย่างควบคุมบวก

H : ตัวอย่างจากกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

Negative control : ตัวอย่างควบคุมลบ

P : ตัวอย่างจากกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

บทที่ 5

อภิปรายผลและบทสรุป

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาถึงความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสตามชนิดของพืชมเบรียในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่เป็นกลุ่มผู้ป่วยคนไทย การศึกษาแบ่งการเก็บข้อมูลเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (กลุ่มศึกษา) แต่ละกลุ่มจะถูกเก็บคราบจุลินทรีย์จากใต้เหงือกโดยจะทำการเก็บจากร่องเหงือกที่มีความลึกต่างกันที่ตำแหน่งซี่ฟันต่างกันของผู้ป่วย 1 ราย ในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะทำการเก็บที่ระดับความลึก 1-3 มิลลิเมตร 4-5 มิลลิเมตรและมากกว่า 5 มิลลิเมตร แต่ละระดับความลึกจะทำการเก็บคราบจุลินทรีย์ใต้เหงือกไม่เกิน 2 ตัวอย่างจากซี่ฟันที่ต่างกัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ในห้องทดลอง วิธีพีซีอาร์นั้นเป็นที่ยอมรับว่ามีความไวและมีความจำเพาะสูงในการวิเคราะห์การพบเชื้อแบคทีเรีย^(18,59) การวิเคราะห์การพบเชื้อโดยวิธีพีซีอาร์ซึ่งใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ็นสามารถตรวจพบเชื้อได้แม้มีปริมาณของเชื้อต่ำเพียง 25-100 เซลล์⁽¹⁸⁾ และสามารถพบยีนชนิดนี้ปรากฏอยู่ในแบคทีเรียเสมอ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีการเรียงตัวของเบสที่แตกต่างกัน นั่นก็คือยีนชนิดนี้มีความจำเพาะสูงในเชื้อแต่ละชนิด (highly conserved within a species)⁽¹⁸⁾

จากการศึกษาในครั้งนี้ความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสในระดับบุคคลสามารถพบได้ 3 รายจากผู้ป่วยไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 21.43 และพบในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ 30 ราย จากผู้ป่วยทั้งสิ้น 34 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 88.24 ส่วนการพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสในระดับตำแหน่งพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะสามารถพบเชื้อได้ร้อยละ 17.86 ส่วนในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะสามารถพบเชื้อได้ร้อยละ 75.95 เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์ตามความลึกของร่องเหงือกเป็น 3 กลุ่มจะพบว่ากลุ่มที่ระดับความลึกของร่องเหงือก 1-3 มิลลิเมตรสามารถพบเชื้อได้ร้อยละ 61.54 กลุ่มที่มีระดับความลึกของร่องเหงือกปริทันต์ 4-5 มิลลิเมตรสามารถพบเชื้อได้ร้อยละ 76.67 และกลุ่มที่มีระดับความลึกของร่องเหงือกปริทันต์มากกว่า 5 มิลลิเมตรจะสามารถพบเชื้อได้ร้อยละ 91.30 นั่นคือในตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ (ความลึกของร่องเหงือกตั้งแต่ 4 มิลลิเมตรขึ้นไป) จะสามารถพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสได้ร้อยละ 83.02 จากข้อมูลจะพบว่าทั้งในระดับบุคคลและระดับตำแหน่ง ผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะมีโอกาสตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสได้มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ เมื่อพิจารณาต่อมาเฉพาะในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะพบว่าเมื่อระดับความลึกของร่องเหงือกที่มากขึ้นจะมีโอกาสพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสได้มากขึ้นเช่นกัน

เมื่อนำข้อมูลการพบเชื้อมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์กับการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (ในระดับบุคคล) พบว่า การพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสมีความสัมพันธ์กับการ

เป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ดังกล่าวในกลุ่มของผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจะมีความลึกของร่องลึกปริทันต์มาเกี่ยวข้องด้วย ซึ่งทำให้ค่าเฉลี่ยของความลึกร่องเหงือกมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์มากอาจส่งผลต่อการพบเชื้อได้ จึงทำการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการพบเชื้อกับการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ (ในระดับตำแหน่งที่มีความลึกร่องเหงือกเท่ากัน) โดยในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะนำข้อมูลการพบเชื้อในร่องเหงือกที่มีความลึก 1-3 มิลลิเมตร มาทำการวิเคราะห์ (ระดับความลึกของร่องเหงือกเท่ากันใน 2 กลุ่ม) พบว่าที่ตำแหน่งความลึกของร่องเหงือก 1-3 มิลลิเมตร การพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสมีความสัมพันธ์กับการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นั่นคือสามารถสรุปได้ว่าการพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสมีความสัมพันธ์กับการเป็นหรือไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบทั้งในระดับบุคคลและระดับตำแหน่ง ซึ่งเป็นไปในทิศทางที่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (ตาราง 10) ที่มีการศึกษาถึงความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในกลุ่มที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ

ตาราง 10 ได้แสดงความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสที่ตรวจพบจากการศึกษาโดยวิธีพีซีอาร์พบว่าค่าความชุกของการพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสจะมีค่าที่แตกต่างกัน ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้จากการแบ่งกลุ่มประชากร ลักษณะของประชากรที่ได้ทำการศึกษา การแบ่งชนิดและความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบ เป็นต้น แม้ว่าความชุกของการพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสจะมีค่าตัวเลขที่แตกต่างกันแต่แนวโน้มของการพบมีลักษณะไปในแนวทางเดียวกัน คือสามารถพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในกลุ่มคนที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบทั้งการศึกษาในกลุ่มชาวเอเชียด้วยกันและการศึกษาในกลุ่มชาวตะวันตก ดังเช่นการศึกษาของ Miura และคณะ⁽⁶⁰⁾ ในปี ค.ศ. 2005 ในกลุ่มตัวอย่างชาวญี่ปุ่นพบว่าการศึกษาระดับตำแหน่งสามารถพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์ได้ร้อยละ 16.80 ส่วนในกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบพบได้ร้อยละ 79.80 การศึกษาของ Amano และคณะ⁽⁶¹⁾ ในปี ค.ศ. 2000 ที่ทำการศึกษากลุ่มคนญี่ปุ่นเช่นกัน พบความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในระดับบุคคลในกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบได้ร้อยละ 36.30 ส่วนในกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบพบได้ร้อยละ 87.10 ความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสที่พบจากการศึกษาทั้งสองมีค่าความชุกใกล้เคียงกับค่าความชุกที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ส่วนการศึกษาอื่นๆในกลุ่มตัวอย่างชาวตะวันตกก็เป็นไปในลักษณะเดียวกันที่สามารถพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสได้มากขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ เช่นการศึกษาของ Griffen และคณะ⁽¹⁹⁾ ในปี ค.ศ. 1999 ในกลุ่มตัวอย่างชาวอเมริกาพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในระดับบุคคลในกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบได้ร้อยละ 25 และในกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบพบได้ร้อยละ 79 การศึกษาของ Matto และคณะ⁽⁶²⁾ ในปี ค.ศ. 1998 เป็นการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างชาวฟินแลนด์สามารถพบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบได้ร้อยละ 33.30 ส่วนในกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบพบได้ร้อยละ 70 นอกจากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ถึงการศึกษาความชุกพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालีสในกลุ่มตัวอย่างคนไทยในการศึกษาอื่นก็พบผลการศึกษาที่สอดคล้องกัน เช่น การศึกษาของ Chanchaimongkol และคณะ⁽⁶³⁾ ในปี ค.ศ.

2005 พบความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสใน ระดับบุคคลในกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบได้ ร้อยละ 45 ส่วนกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบพบได้ ร้อยละ 90

เมื่อนำผลการศึกษาในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์และค่าทางคลินิกอื่นๆ พบว่าในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบนั้น การพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีความสัมพันธ์กับระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์และมีความสัมพันธ์กับระดับการยืดเกาะของเนื้อเยื่อทางคลินิก ดัชนีวัดการอักเสบของเหงือกและดัชนีวัดการโยกของฟันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อหาความสัมพันธ์ต่อการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสกับระดับความลึกของร่องลึกปริทันต์และค่าการยืดเกาะของเนื้อเยื่อทางคลินิกพบว่า การพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสมีความสัมพันธ์กับค่าทางคลินิกทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาพร้อมกับภาพประกอบ 6 จะพบว่าถ้าค่าทางคลินิกทั้งสองสูงขึ้นจะมีโอกาสพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งผลการวิเคราะห์ดังกล่าวมีความสอดคล้องไปกับการศึกษาในตาราง 10 ที่พบว่ามีการศึกษาได้แบ่งกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบออกเป็นกลุ่มตามความลึกของร่องลึกปริทันต์ดังเช่นการศึกษาของ Klein และคณะ⁽⁶⁴⁾ ในปี ค.ศ. 2003 พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสในระดับบุคคลที่มีร่องลึกปริทันต์น้อยกว่า 6 มิลลิเมตรได้ร้อยละ 40 ส่วนบุคคลที่มีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 6 มิลลิเมตรขึ้นไปพบได้ร้อยละ 90 การศึกษาของ Fujise และคณะ⁽⁶⁵⁾ ในปี ค.ศ. 2002 พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสใน ระดับตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์น้อยกว่า 6 มิลลิเมตรได้ร้อยละ 79.40 ส่วนตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 6 มิลลิเมตรขึ้นไปพบได้ร้อยละ 87 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้เช่นกันที่สามารถพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสใน ระดับตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์น้อยกว่า 6 มิลลิเมตรได้ร้อยละ 69.64 ตำแหน่งที่มีร่องลึกปริทันต์ตั้งแต่ 6 มิลลิเมตรขึ้นไปสามารถพบได้ร้อยละ 91.30 แสดงว่าในกลุ่มที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ระดับร่องลึกปริทันต์ที่ลึกมากขึ้นจะมีโอกาสพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสที่มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งในการศึกษาของ Kawada และคณะ⁽⁶⁶⁾ ในปี ค.ศ. 2004 พบว่าทุกๆ 1 มิลลิเมตรของความลึกร่องลึกปริทันต์ที่เพิ่มขึ้นจะสามารถพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสได้เพิ่มขึ้น 10 เท่าและยังพบอีกว่าจำนวนของเชื้อที่พบมีความเกี่ยวพันเป็นอย่างมากกับสถานะของเนื้อเยื่อปริทันต์

ตาราง 10 ผลการศึกษาเรื่องความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสโดยวิธีพีซีอาร์

Reference	Country	Study groups	Prevalence
Chanchaimongkol et al. (2005) ⁽⁶³⁾	Thailand	20 Healthy	45%
		20 Mild chronic periodontitis	85%
		20 Moderate to severe chronic periodontitis	95%

ตาราง10 (ต่อ) ผลการศึกษาเรื่องความชุกของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวาลิสโดยวิธีพีซีอาร์

Reference	Country	Study groups	Prevalence
Miura et al. (2005) ⁽⁶⁰⁾	Japan	95 sites (22 healthy subjects)	16.8%
		223 sites (18 aggressive periodontitis)	79.8%
Van Der Ploeg et al. (2004) ⁽⁶⁷⁾	Norway	12 Healthy	9%
		17 Chronic periodontitis	71%
Takeuchi et al. (2003) ⁽⁶⁸⁾	Japan	103 subjects;	
		Healthy	5.6%
		Localized juvenile periodontitis	90%
		Generalized juvenile periodontitis	82.5%
Klein et al. (2003) ⁽⁶⁴⁾	Brazil	Generalized chronic periodontitis	97.1%
		10 Healthy	10%
		10 periodontitis with pocket ≤ 5 mm.	40%
		10 periodontitis with pocket > 5 mm.	90%
Beikler et al. (2003) ⁽⁷⁾	Germany	203 periodontitis	50.25%
Avila-Campos & Velasques-melendez (2002) ⁽⁶⁹⁾	Brazil	50 Healthy	66%
		50 periodontitis	78%
Fujise et al. (2002) ⁽⁶⁵⁾	Japan	1,149 sites (104 subjects)	
		Healthy sites	38%
		Sites with pocket < 6 mm.	79%
		Sites with pocket ≥ 6 mm.	87%
Ishizuka (2002) ⁽⁷⁰⁾	Japan	40 Chronic periodontitis	57.5%
Takeuchi et al. (2001) ⁽⁷¹⁾	Japan	123 subjects;	
		20 Healthy	10%
		38 Advanced periodontitis	84.2%
		65 Chronic periodontitis	95.3%
Nozaki et al. (2001) ⁽⁵⁹⁾	Japan	31 periodontitis	80%
Doungudomdacha et al. (2001) ⁽⁷²⁾	UK	50 periodontitis	93.9%

ตาราง10 (ต่อ) ผลการศึกษาเรื่องความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสโดยวิธีพีซีอาร์

Reference	Country	Study groups	Prevalence
Yuan et al. (2001) ⁽⁷³⁾	Taiwan	246 periodontitis subjects; 105 non-insulin-dependent diabetes, 141 no diabetes	46.7-66.7% sites; No difference between groups
Amano et al. (2000) ⁽⁶¹⁾	Japan	591 subjects; 380 Healthy 139 periodontitis	36.3% 87.1%
Choi et al. (2000) ⁽⁷⁴⁾	Korea	128 sites (20 Healthy subjects) 116 sites (29 Advanced periodontitis)	18% (30%) More than 96% (100%)
Darby et al. (2000) ⁽⁷⁵⁾	UK	33 Severe periodontitis 24 Generalized EOP (early-onset periodontitis)	54.5% 2.5%
Kasuga et al. (2000) ⁽⁷⁶⁾	Japan	160 sites (60 periodontitis patients)	75.5%
Griffen et al. (1999) ⁽¹⁹⁾	USA	311 subjects; 181 Healthy 130 Chronic periodontitis	25% 79%
Amano et al. (1999) ⁽⁶⁾	Japan	93 periodontitis	78.5%
Matto et al. (1997) ⁽⁶²⁾	Finland	9 Healthy 40 Adult periodontitis	33.3% 70%
Ashimoto et al. (1996) ⁽¹⁸⁾	USA	150 subjects; Pediatric gingivitis Adult gingivitis Advanced periodontitis	14% 10% 70%
Leys et al. (1994) ⁽⁷⁷⁾	USA	52 Chronic periodontitis	79%

ดัดแปลงเพิ่มเติมจากการศึกษาของ Sanz และคณะ ในปีค.ศ. 2004⁽⁷⁸⁾

ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียในตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ได้ทำการวิเคราะห์โดยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อฟิมเบรียชนิดที่ 1-4 ตามการศึกษาของ Amano และคณะ⁽⁶⁾ และไพรเมอร์ของ Nakagawa และคณะ⁽⁵³⁾ ที่มีความจำเพาะต่อฟิมเบรียชนิดที่ 5 (ตาราง3) ส่วนฟิมเบรียชนิด 1 นั้น สามารถถูกวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนฟิมเบรีย

ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์อาร์ซาวัน (RsaI enzyme) ถ้าดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นยีนฟิมเบรีชนิด 1 ก็จะได้พบว่าภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์แล้วจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 109 และ 162 คู่เบส⁽⁵⁴⁾

ในการศึกษาโดยชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของฟิมเบรีดังกล่าวพบว่าไม่สามารถระบุชนิดของฟิมเบรีได้ ทั้งๆที่ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิส ซึ่งเป็นไปได้ว่าไม่เกิดการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ เกิดจากการที่ดีเอ็นเอที่ได้ทำการสกัดออกมาจะมีดีเอ็นเอของเชื้อหรือเซลล์อื่นๆปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งดีเอ็นเอเหล่านั้นจะเป็นตัวขัดขวางการเข้าจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการวิเคราะห์ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงต่อชนิดของฟิมเบรี จึงมีข้อด้อยในเรื่องของความไวในการเข้าจับกับดีเอ็นเอ กล่าวคือ จะสามารถจับกันได้ต่อเมื่อดีเอ็นเอต้นแบบเป็นยีนฟิมเบรีชนิดเดียวกันกับชนิดของฟิมเบรีที่ไพรเมอร์จำเพาะอยู่ ดังนั้นโอกาสจับกันระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์จึงเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้อาจมีสาเหตุจากความไม่เหมาะสมในการเลือกใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากคราบจุลินทรีย์ตัวอย่าง แม้ว่าวิธีการสกัดที่ใช้สามารถตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิสในความซุกที่ใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นๆก็ตาม ทั้งนี้ในการตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนสจิงจิวัลิสเป็นการตรวจจากยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ ซึ่งถือว่าเป็นยีนจำบ้านที่สามารถตรวจพบได้ง่ายและเหมาะที่จะนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการวิเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์⁽¹⁸⁾ ในทางตรงกันข้ามยีนฟิมเบรีเป็นลักษณะของยีนเดี่ยว (single copy gene)⁽²⁸⁾ นั้นหมายถึงจะมียีนฟิมเบรีเพียงตำแหน่งเดียวบนสายดีเอ็นเอ (ในขณะที่ยีน 16เอส-อาร์อาร์เอ็นเอ จะมีได้หลายตำแหน่ง⁽¹⁸⁾) ทำให้เกิดความยากที่จะวิเคราะห์ได้จากวิธีพีซีอาร์ ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอหากมียีนฟิมเบรีจำนวนน้อยหรือเกิดความเสียหายอาจจะส่งผลต่อผลการวิเคราะห์ได้

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ในการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรี ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นนี้จะออกแบบจากลำดับเบสของยีนฟิมเบรี เมื่อนำลำดับเบสของยีนฟิมเบรีจากข้อมูลที่มาจากระบบธนาคารยีน (Genbank) มาทำการจัดเรียงจะพบตำแหน่งที่มีการเรียงลำดับเบสเหมือนกันและต่างกัน ในการออกแบบได้เลือกตำแหน่งที่มีการจัดเรียงเบสที่เหมือนกันมาใช้เป็นไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนี้จึงสามารถจับได้กับยีนฟิมเบรีทุกชนิดและให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ครอบคลุมส่วนที่มีความแตกต่างของลำดับเบสในฟิมเบรีแต่ละชนิด จากนั้นจึงนำไปแยกชนิดของฟิมเบรีในภายหลัง โดยใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเข้าตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ ซึ่งเป็นไปได้ตามหลักการวิเคราะห์โดยวิธีที่เรียกว่าพีซีอาร์ร่วมกับการแยกความแตกต่างของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะนี้ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสายดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลงต่าง ๆ กันและแสดงความจำเพาะของฟิมเบรีแต่ละชนิดด้วยขนาดของดีเอ็นเอที่ต่างกัน ในการศึกษารั้งนี้ใช้เอนไซม์เฮ3 (HaeIII enzyme) เพื่อการแยกชนิดของฟิมเบรีชนิดที่ 1-5 และ 1บี แต่ในการบ่งบอกการเป็นฟิมเบรีชนิดที่ 5 จะต้องใช้เอนไซม์อาร์ซา1 (RsaI enzyme) ตัดผลิตภัณฑ์เพื่อยืนยันดีเอ็นเอของฟิมเบรีชนิดที่ 5 อีกครั้งหนึ่ง

ไพรเมอร์ที่ทำการพัฒนาขึ้นใหม่นี้ได้ทำการออกแบบให้สามารถจับกับยีนฟิมเบรียได้ทั้ง 6 ชนิด (ชนิดที่ 1-5 และชนิด 1บี) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการจับกันของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เรียกไพรเมอร์ที่ได้รับพัฒนาขึ้นนี้ว่า “ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย” ส่วนลำดับการเรียงตัวของเบสในยีนฟิมเบรียแต่ละชนิดที่นำมาทำการวิเคราะห์ ได้แก่

- ฟิมเบรียชนิดที่ 1 วิเคราะห์จากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์ BH18/10 และสายพันธุ์ 381

- ฟิมเบรียชนิดที่ 1บี วิเคราะห์จากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์ HG1691

- ฟิมเบรียชนิดที่ 2 วิเคราะห์จากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์ D17797, OMZ314, OMZ409, TDC59, TDC60, TDC117, TDC120, TDC222, TDC243, TDC275 และสายพันธุ์ TDC285

- ฟิมเบรียชนิดที่ 3 วิเคราะห์จากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์ ATCC49417 และสายพันธุ์ 6/26

- ฟิมเบรียชนิดที่ 4 วิเคราะห์จากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์ D38373 และสายพันธุ์ HG564

- ฟิมเบรียชนิดที่ 5 วิเคราะห์จากพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิวัลิส สายพันธุ์ AB027294

ลำดับเบสของยีนฟิมเบรียทั้ง 6 ชนิด ถูกนำมาจัดเรียงเพื่อหาตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) (ภาพประกอบ11) โดยใช้โปรแกรมจัดเรียงลำดับเบสคลัสตอลเอ็กซ์ (clustalx 1.64b) พบว่ายีนฟิมเบรียแต่ละชนิดมีความเหมือนและต่างกันในการจัดเรียงลำดับเบส จึงได้ทำการเลือกช่วงของลำดับเบสที่มีการเรียงตัวคล้ายกันมากที่สุดเพื่อนำมาออกแบบเป็นฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอของฟิมเบรียได้ทุกชนิด ส่วนรีเวอร์สไพรเมอร์คงใช้ของ Amano และคณะ⁽⁶⁾ เช่นเดิม

หลังจากเลือกช่วงเบสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้เป็นฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ได้แล้ว ได้นำช่วงเบสดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ถึงความเหมาะสมที่จะนำมาใช้จริงในกระบวนการพีซีอาร์ ในขั้นตอนนี้ทำการวิเคราะห์โดยอาศัยโปรแกรมโอลิโก (Oligo v.3.4) โปรแกรมดังกล่าวจะบอกถึงช่วงอุณหภูมิที่มีการจับกันระหว่างสายดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ (annealing temperature) ที่ได้ออกแบบไว้ จากการวิเคราะห์ของทั้ง 2 โปรแกรมพบว่าลำดับเบสที่เหมาะสมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียคือ ช่วงลำดับเบสที่มีการเรียงตัว TGT TGG GAC TTG CTG CTC TTG C (ลำดับเบสในช่องสี่เหลี่ยมในภาพประกอบ5) ส่วนอุณหภูมิที่มีการจับกันระหว่างสายดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส ส่วนกระบวนการอื่นๆในกระบวนการพีซีอาร์ใช้รอบอุณหภูมิและเวลาเหมือนกับการศึกษาด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดฟิมเบรีย

CLUSTAL X (1.64b) multiple sequence alignment

60

```

BH18/10_1 -----AATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
381_1 -----AATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
HG1691_1b -AATTCGATTAATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
TDC285_2 ACTAGTGATTAATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
TDC275_2 -----GATTAATCGGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
OMZ409_2 -----AATCTGAACGAACTACGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
OMZ314_2 -----AATCTGAACGAACTACGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
6/26_3 -----AATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
ATCC49417_3 -----AATCTGAACGAACTACGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
HG564_4 -----AATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
D38373_4_ -----AATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATGGGAAA
AB027294_5_ -----AATCTGAACGAACTGCGACGCTATATGCAAGACAATCTCTAAATG-AAAA
                **** *

```

```

BH18/10_1 AGATTAGATTTTGTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
381_1 AGATTAGATTTTGTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
HG1691_1b AGATTAGATTCTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
TDC285_2 AGATT-----CTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
TDC275_2 AGATT-----CTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
OMZ409_2 AGATTAGATTCTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
OMZ314_2 AGATT-----CTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
6/26_3 AGATT-----CTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
ATCC49417_3 AGATTAGATTCTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
HG564_4 AGATT-----CTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
D38373_4_ AGATT-----CTTAGAAAACAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
AB027294_5_ AGATT-----CTTAGAAA-CAATATTCACTTTTAAAAACAAAAACGAGATGAAAAAACAA
                **** *

```

```

BH18/10_1 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
381_1 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
HG1691_1b AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
TDC285_2 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
TDC275_2 AGTTTGTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
OMZ409_2 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
OMZ314_2 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
6/26_3 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
ATCC49417_3 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
HG564_4 AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
D38373_4_ AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
AB027294_5_ AGTTTTTC TGTTGGGACTTGCTGCTCTTGCTATGACAGCTTGTAACAAAGACAACGAGG
                **** *

```

```

BH18/10_1 CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
381_1 CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
HG1691_1b CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
TDC285_2 CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
TDC275_2 CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
OMZ409_2 CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
OMZ314_2 CAGAACCCGTTACAGAAGGTAATGCCACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
6/26_3 CAGAACCCGTTACAGAAAGTAATGCTACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
ATCC49417_3 CAGAACCTGTTACAGAAGGTAATGCTACCATCAGCGTGGTATTGAAGACCAGCAATTCGA
HG564_4 CAGAACCCATTGTGAAACTGACGCTACTGTTAGTTTCATAATTAAGAGCGGAGAGGGGC
D38373_4_ CAGAACCCGTTGTAGAACTAACGCTACTGTTAGTTTCATAATTAAGAGCGGTGAGGGGC
AB027294_5_ CAGAACCCATTGTGAAACTGACGCTACTGTTAGTTTCATAATTAAGGCTGCTCGCCAC
                **** *

```

300

```

BH18/10_1 ATCGTGCTTTTGGAGTT---G---GCGATGAC---GAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
381_1 ATCGTGCTTTTGGAGTT---G---GCGATGAC---GAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
HG1691_1b ATCGTGCTTTTGGAGTT---G---GCGATGAC---GAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
TDC285_2 ATCGTGCTTTTGGAGA-----AGAC---GAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
TDC275_2 ATCGTGCTTTTGGAGA-----AGAC---CAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
OMZ409_2 ATCGTGCTTTTGGAGA-----AGAC---GAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
OMZ314_2 ATCGTGCTTTTGGAGA-----AGAC---GAATCAAAGGTGGCTAAGTTGACCG
6/26_3 ATCGTGCTTTTGGAAAT---G---CGGGAGAC---GAAGCAAAAGTGGCTAAACTGACTG
ATCC49417_3 ATCGTGCTTTTGGAAAT---G---CGGGAGAC---GAAGCAAAAGTGGCTAAGTTGACCG

```

ภาพประกอบ 11 การจัดเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิดต่างๆ

HG564_4_	GTGCTGTAGGCGA-----TGGCCTTG-CAG--ATGCCAAGATCACAAAAGTCACCG
D38373_4_	GTGCTGTAGGCGA-----TGGCCTTG-CAG--ATGCCAAGATCACAAAAGTCACCG
AB027294_5_	AACGTGAAACAGAACCCAACAGTCTCCTTGACAGTGATGCCAAATCACCAAATTGACAG
	*** ** *
BH18/10_1	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
381_1	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
HG1691_1b	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
TDC285_2	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
TDC275_2	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
OMZ409_2	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
OMZ314_2	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
6/26_3	TAATGGTTTATAATGGAGAACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGTCGAAAATGC-AAT----
ATCC49417_3	TAATGGTTTACAAGGGTGACAGCAGGAAGCCATCAAATCAGCCGAAAATGC-GAC----
HG564_4_	CCATGGTCTATGCAGGTCAAATTCAGGAAGGGATTAAGACAGTGGAAAGAGGCGGAG
D38373_4_	CCATGGTCTATGCAGGTCAAATTCAGGAAGGGATTAAGACAGTGGAAAGAGGCGGAG
AB027294_5_	CTATGGTCTATGCAGGTCAAATTCAGGAAGGAATTAAGACTGTAGAAGATGCTGACAACG
	***** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BH18/10_1	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
381_1	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
HG1691_1b	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
TDC285_2	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
TDC275_2	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
OMZ409_2	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
OMZ314_2	----TAAGGTTGAAGACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
6/26_3	----TAAGGTTGAAAACATCAAATGTGGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTTGTAATGG
ATCC49417_3	----TAAGGTTGAAAACATCAAATGTAGTGCAGG--CCAAC-GTACGCTGGTCGTAATGG
HG564_4_	TTCTTAAAGTAGAAGGAATTCCTGTAAATCAGGAGCCAACCGTGTCTCGTCGTTGTAG
D38373_4_	TCCTTAAAGTAGAAGGAATTCCTGTAAATCTGGAGCCAACCGTGTCTCGTCGTTGTAG
AB027294_5_	TACTCAAAGTTGAAGGATCAAATGTAATCAGGAGCAAACAAAGTATTGGTTGTTGTG
	** ** * ** ** * ** * ** * ** * ** *
BH18/10_1	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
381_1	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
HG1691_1b	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
TDC285_2	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
TDC275_2	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
OMZ409_2	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
OMZ314_2	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
6/26_3	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
ATCC49417_3	CCAAT-ACGGGTGCAATG-----GAAGTGGTTGGCAAGACTCTTGCAG
HG564_4_	CTAATCA---CAATTATG-----AGCTTACCGGTAAAAGTTTGAATG
D38373_4_	CCAATCA---CAATTATG-----AGCTTACCGGTAAAAGTTTGAATG
AB027294_5_	CCAATTATGACAAAAATGCAGGTGGAGACGCGATTGACTTTACCGGAAAAACGTTGGATC
	* ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BH18/10_1	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
381_1	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
HG1691_1b	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
TDC285_2	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
TDC275_2	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
OMZ409_2	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
OMZ314_2	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
6/26_3	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
ATCC49417_3	AGGTAAAAAGCATTGACAACCTGAACTGACTGCAGAAAACCAAGAGGCTGCAGGGTTGATCA
HG564_4_	AGGTTGAGGCCTTGACGACTTCTTTGACAGCTGAAAAACCAAAATGCCAAAAAATTGATCA
D38373_4_	AGGTTGAGGCCTTGACGACTTCTTTGACAGCTGAAAAACCAAAATGCCAAAAAATTGATCA
AB027294_5_	AGGTAAAGCTATGACGATCCAACCTGACGCAGGACAATCAAAGCGCAAAAGTTCTTGATTA
	* ** * ** * ** * ** * ** * ** *
BH18/10_1	TGACAGCAGAGCCAAAAACAATCGTTTTGAAGGCAGGCAAGAACTACATTGGATAC---A
381_1	TGACAGCAGAGCCAAAAACAATCGTTTTGAAGGCAGGCAAGAACTACATTGGATAC---A
HG1691_1b	TGACAGCAGAGCCAAAAACAATCGTTTTGAAGGCAGGCAAGAACTACATTGGATAC---A
TDC285_2	TGACAGCAGAGCCTGTTGTGGTAACACTTGTGCGCCGGCAATAACTATTATGGTTAT---G
TDC275_2	TGACAGCAGAGCCTGTTGTGGTAACACTTGTGCGCCGGCAATAACTATTATGGTTAT---G
OMZ409_2	TGACAGCAGAGCCTGTTGACGTAACACTTGTGCGCCGGCAATAACTATTATGGTTAT---G
OMZ314_2	TGACAGCAGAGCCTGTTGACGTAACACTTGTGCGCCGGCAATAACTATTATGGTTAT---G

6/26_3	GTGACAGCAGAGCCTGTTGAGGTAACACTTGTGCGCCGGCAATAACTATTATGGTTAT---G
ATCC49417_3	GTGACAGCAGAGCCTGTTGAGGTAACACTTGTGCGCCGGCAATAACTATTATGGTTAT---G
HG564_4	GTGACAGGTAAGTCAGCAGCTTTTACAATCAAGCCGGGCTCCAACCACTATGGCTATCCTG
D38373_4_	GTGACAGGTAAGTCAGCAGCTTTTACAATCAAAACCGGGCTCCAACCACTATGGCTATCCTG
AB027294_5_	GTGACAGGAGAATCCAACGCTTTTACTATCAAGCCCCGGAACAACTACTATGGCTATCCCG
	***** * * * * * * * * * * *
BH18/10_1	GTGGA-----ACCGGAGAGGGTAATCACATTGAGAATGAT---CCTCTTAAGATCAAGC
381_1	GTGGA-----ACCGGAGAGGGTAATCACATTGAGAATGAT---CCTCTTAAGATCAAGC
HG1691_1b	GTGGA-----ACCGGAGAGGGTAATCACATTGAGAATGAT---CCTCTTAAGATCAAGC
TDC285_2	ATGGA-----TCTCAGGGAGGTAATCAGATTTTCGCAAAATACTCCTCTTGAAATCAAAC
TDC275_2	ATGGA-----TCTCAGGGAGGTAATCAGATTTTCGCAAAATACTCCTCTTGAAATCAAAC
OMZ409_2	ATGGA-----TCTCAGGGAGGTAATCAGATTTTCGCAAGATACTCCTCTTGAAATCAAAC
OMZ314_2	ATGGA-----TCTCAGGGAGGTAATCAGATTTTCGCAAGATACTCCTCTTGAAATCAAAC
6/26_3	ATGGA-----TCTCAGGGAGGTAATCAGATTTTCGCAAGATACTCCTCTTGAAATCAAAC
ATCC49417_3	ATGGA-----TCTCAGGGAGGTAATCAGATTTTCGCAAGATACTCCTCTTGAAATCAAAC
HG564_4	ATGG-----GACTACATCCGACAACCTTGTCTGCTGGAACCTCTTGCCGTTACTC
D38373_4_	GTGG-----GACTGCATCCGACAACCTTGTCTGCTGGAACCTCTTGCCGTTACTC
AB027294_5_	CTGGAACAGGGACTACACAAGACAACCTCATCGAAACTGGCAACGCTCTTAAGGTGACAC
	*** * * * * * * * * * * *
BH18/10_1	GTGTTTCATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGCGCAGCCTACGATA
381_1	GTGTTTCATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGCGCAGCCTACGATA
HG1691_1b	GTGTACATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGCGCAGCCTACGATA
TDC285_2	GTGTACATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGCCAGTCTTATGCAA
TDC275_2	GTGTACATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGCCAGTCTTATGCAA
OMZ409_2	GTGTTTCATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGTCCGTCTTATGTTA
OMZ314_2	GTGTTTCATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGTCCGTCTTATGTTA
6/26_3	GTGTTTCATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGTCCGTCTTATGTTA
ATCC49417_3	GTGTTTCATGCTCGCATGGCTTTTACCAGAAATTAAGTGCAGATGAGTCCGTCTTATGTTA
HG564_4	GCGTGCATGCCGGTATCTCATTGCGAGGATGAGGTAATATGGCTACACAGTATCAAA
D38373_4_	GCGTGCATGCCGGTATCTCATTGCGAGGATGAGGTAATATGGCTACACAGTATCAAA
AB027294_5_	GTGTTTCATGCGCCATGTCTATCCAAAACGTGACAGTAACGTTGACCCCCAATACTCAA
	* * * * * * * * * * * *
BH18/10_1	ACATTTACACATTCGTC-----CCTGAAAAGATTTATGGTCTCATTGCAAAGAAGCAA
381_1	ACATTTACACATTCGTC-----CCTGAAAAGATTTATGGTCTCATTGCAAAGAAGCAA
HG1691_1b	ACATTTACACATTCGTC-----CCTGAAAAGATTTATGGTCTCATTGCAAAGAAGCAA
TDC285_2	ACAAATACAATTTTGCC-----CCCGAAAACATCTATGCACTTGTGGCTAAAAAGGAG
TDC275_2	ACAAATACAATTTTGCC-----CCCGAAAACATCTATGCACTTGTGGCTAAAAAGGAG
OMZ409_2	ACAAATACAATTTTGCC-----CCCGAAAACATCTATGCACTTGTGGCTAAAAAGGAG
OMZ314_2	ACAAATACAATTTTGCC-----CCCGAAAACATCTATGCACTTGTGGCTAAAAAGGAG
6/26_3	ACAAATACAATTTTGCC-----CCCGAAAACATCTATGCACTTGTGGCTAAAAAGGAG
ATCC49417_3	ACAAATACAATTTTGCC-----CCCGAAAACATCTATGCACTTGTGGCTAAAAAGGAG
HG564_4	ACTACTACTCTTTTAACCCAGCTGACGCTAAAA-TCGCAGCCCTTGTGCAAAAGAAAGAT
D38373_4_	ACTACTACTCTTTTAACCCAGCTGACGCTAAAA-TCGCAGCCCTTGTGCAAAAGAAAGAT
AB027294_5_	GCAACTATTATTTTAA-----GCCGCAAAATGTAGCAGGGTTGATCTGCAAAAAACAA
	* ** * * * * * * * * * *
BH18/10_1	TCTAATTTGTTTCGGGGCAACACTCGTAAATGCAGACGCTAATTATCTGACAGGTTCTTTG
381_1	TCTAATTTGTTTCGGGGCAACACTCGTAAATGCAGACGCTAATTATCTGACAGGTTCTTTG
HG1691_1b	TCTAATTTGTTTCGGGGCAACACTCGTAAATGCAGACGCTAATTATCTGACAGGTTCTTTG
TDC285_2	TCTAATCTATTTCGGTGCTTCATTGGCAAAATGGTGATGATGCTTATTTGACTGGTTCTTTG
TDC275_2	TCTAATCTATTTCGGTGCTTCATTGGCAAAATGGTGATGATGCTTATTTGACTGGTTCTTTG
OMZ409_2	TCTAATCTATTTCGGTGCTTCATTGGCAAAATAGTGATGATGCTTATTTGACTGGTTCTTTG
OMZ314_2	TCTAATCTATTTCGGTGCTTCATTGGCAAAATAGTGATGATGCTTATTTGACTGGTTCTTTG
6/26_3	TCTAATCTATTTCGGTGCTTCATTGGCAAAATAGTGATGATGCTTATTTGACTGGTTCTTTG
ATCC49417_3	TCTAATCTATTTCGGTGCTTCATTGGCAAAATAGTGATGATGCTTATTTGACTGGTTCTTTG
HG564_4	TCTAAGATTTTCGGCAATCTTTGGTCTCAAACTAATGCATATTTGTATGGAGTCCAA
D38373_4_	TCTAAGATTTTCGGCAATCTTTGGTCTCAAACTAATGCATATTTGTATGGAGTCCAA
AB027294_5_	TCTAAGATTTTCGGTGCTTCATTGGATTTTGGCACAGA---CTACCTCGGTGGCGTAGCT
	***** * ***** * * * * * * * * * *
BH18/10_1	ACCACATTTAACGGTGCTTACACACCTGCCAACTATGCCAATGTGCCTTGGCTGAGCCGT
381_1	ACCACATTTAACGGTGCTTACACACCTGCCAACTATGCCAATGTGCCTTGGCTGAGCCGT
HG1691_1b	ACCACATTTAACGGTGCTTACACACCTGCCAATGTGCCTTGGCTGAGCCGT
TDC285_2	ACGAATTTCAACGGTGCTTATCCCTGCAAACTATACTCATGTTGACTGGTTGGGAAGA
TDC275_2	ACGAATTTCAACGGTGCTTATCCCTGCAAACTATACTCATGTTGACTGGTTGGGAAGA

ภาพประกอบ 11 (ต่อ) การจัดเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิดต่างๆ

OMZ409_2 ACGAATTTCAACGGTGCTTATTTCCCTGCAAACTATACTCATGTTGACTGGTTGGGAAGA
 OMZ314_2 ACGAATTTCAACGGTGCTTATTTCCCTGCAAACTATACTCATGTTGACTGGTTGGGAAGA
 6/26_3 ACGAATTTCAACGGTGCTTATTTCCCTGCAAACTATACTCATGTTGACTGGTTGGGAAGA
 ATCC49417_3 ACGAATTTCAACGGTGCTTATTTCCCTGCAAACTATACTCATGTTGACTGGTTGGGAAGA
 HG564_4 ACGCCTGCC---GGTCTTTACACTCCGGA-TGCTGCAGGAGAAACATACGAATTGGAGGC
 D38373_4_ ACGCCTGCC---GGTCTTTACACTCCGGA-TGCTGCAGGAGAAACATACGAATTGGAGGC
 AB027294_5_ ACTACAGCT---GCAGCTTATACTCCGACCTCTACGATAACAGCGTAAGC--TGG----
 ** * ** * ** * *

BH18/10_1 AATTGCGTTGC-----ACC--TGCCGCCGATGCTCCTCAGGGTTTCTACGTATTAGAA
 381_1 AATTACGTTGC-----ACC--TGCCGCCGATGCTCCTCAGGGTTTCTACGTATTAGAA
 HG1691_1b GATTACATTGC-----ACC--TACCGCCGATGCTCCTCAGGGTTTCTACGTATTAGAA
 TDC285_2 GACTACACAGA-----GCC--TTCCAATAATGCTCCACAAGGTTTCTATGTTTTGGAG
 TDC275_2 GACTACACAGA-----GCC--TTCCAATAATGCTCCACAAGGTTTCTATGTTTTGGAG
 OMZ409_2 GACTACACAGA-----GCC--TTCCAATAATGCTCCACAAGGTTTCTATGTTTTGGAG
 OMZ314_2 GACTACACAGA-----GCC--TTCCAATAATGCTCCACAAGGTTTCTATGTTTTGGAG
 6/26_3 GACTACACAGAAATAGGAGCCGCTACTGTTAACTCCGAAGGGATTCTATGCTTGGAG
 ATCC49417_3 GACTTCACAGA-----GCC--TTCCAATAATGCTCCACAAGGTTTCTATGTTTTGGAG
 HG564_4 GTCT---TTGA-----ATACGAATTATGCTGTAGGTGCCGGCTTCTATGTGCTGGAA
 D38373_4_ GTCT---TTGA-----ATACGAATTATGCTGTAGGTGCCGGCTTCTATGTGCTGGAA
 AB027294_5_ -----TTGA-----CCAAGCCTTACGCCGAAAAGCGGCTTCTATATTATGGAA
 * ** * ** *

BH18/10_1 AATGACTACTCAGCTAACGGTGGAACCTATTCATCCGACAATCCTGTGTGTTTATGGCAAA
 381_1 AATGACTACTCAGCTAACGGTGGAACCTATTCATCCGACAATCCTGTGTGTTTATGGCAAA
 HG1691_1b AATGACTACTCAGCTAACGGTGGAACCTATTCATCCGACAATCCTGTGTGTTTATGGCAAA
 TDC285_2 AGCACATAC---GCTCAGAATGCAGGTCTACGTCTACTATTCTATGTGTAAAAGGTAAG
 TDC275_2 AGCACATAC---GCTCAGAATGCAGGTCTACGTCTACTATTCTATGTGTAAAAGGCAAG
 OMZ409_2 AGCACATAC---GCTCAGAATGCAGGTCTACGTCTACTATTCTATGTGTAAAAGGCAAG
 OMZ314_2 AGCACATAC---GCTCAGAATGCAGGTCTACGTCTACTATTCTATGTGTAAAAGGCAAG
 6/26_3 AGCACATAC---GCTCAGAATGCAGGTCTACGTCTACTATTCTATGTGTAAAAGGCAAG
 ATCC49417_3 AGCACATAC---GCTCAGAATGCAGGTCTACGTCTACTATTCTATGTGTAAAAGGCAAG
 HG564_4 AGTAAATATGATGCAAGCAAC---GAGCTTCGTCCGACGATCCTTTGTATCTATGGAAAG
 D38373_4_ AGTAAATATGATGCAAGCAAC---GAGCTTCGTCCGACGATCCTTTGTATCTATGGAAAG
 AB027294_5_ AGCGTATATCAGGTTGGCAAC---AATCTTCGTCTACTATTCTTTGCGTATATGGTAAG
 * ** * * * * * * * *

BH18/10_1 CTT----CAGAAAAACGGAGCCGACTTGCGGGAGCCGATTTAGCAGCTGCTCAGGCCGC
 381_1 CTT----CAGAAAAACGGAGCCGACTTGCGGGAGCCGATTTAGCAGCTGCTCAGGCCGC
 HG1691_1b CTT----CAGAAAAACGGAGCCGACTTGCGGGAGCCGATTTAGCAGCTGCTCAGGCCGC
 TDC285_2 CTGA-CAAAGCATGATGGTACTCTTTGAGTTCTGAGGAAATGACAGCTGCATTCAATGC
 TDC275_2 CTGA-CAAAGCATGATGGTACTCTTTGAGTTCTGAGGAAATGACAGCTGCATTCAATGC
 OMZ409_2 CTGA-CAAAGCATGATGGTACTCTTTGAGTTCTGAGGAAATGACAGCTGCATTCAATGC
 OMZ314_2 CTGA-CAAAGCATGATGGTACTCTTTGAGTTCTGAGGAAATGACAGCTGCATTCAATGC
 6/26_3 CTGA-CAAAGCATGATGGTACTCTTTGAGTTCTGAGGAAATGACAGCTGCATTCAATGC
 ATCC49417_3 CTGA-CAAAGCATGATGGTACTCTTTGAGTTCTGAGGAAATGACAGCTGCATTCAATGC
 HG564_4 CTGCTCGATA-AGGACGGCAACCCTCTCACGGAACCAAGCCTTACGGATGCTATAAATGC
 D38373_4_ CTGCTCGATA-AGGACGGCAACCCTCTCACGGAACCAAGCCTTACGGATGCTATAAATGC
 AB027294_5_ CTAAGAAAAACAGAAACACAAGACT-TTTCTCAAGAGGAATTGGATGCTGCTGTGGCTGC
 ** * * * * * * *

BH18/10_1 CAATTGGGTGGATG--CAGAAGGC----AAGACCTATTACCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 381_1 CAATTGGGTGGATG--CAGAAGGC----AAGACCTATTACCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 HG1691_1b CAATTGGGTGGATG--GACAAGGC----AAGACCTATTACCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 TDC285_2 CGGCTGGATTGTTGCAGACAATGATCCTACGACCTATTATCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 TDC275_2 CGGCTGGATTGTTGCAGACAATGATCCTACGACCTATTATCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 OMZ409_2 CGGCTGGATTGTTGCAGACAATAATCCTACGACCTATTACCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 OMZ314_2 CGGCTGGATTGTTGCAGACAATAATCCTACGACCTATTACCCTGTATTGGTAAACTTCAA
 6/26_3 CGGCTGGATTGTTGCAACAATGATCCTACGACCTATTATCCTGTATTAGTGAACCTTTGA
 ATCC49417_3 CGGCTGGATTGTTGCAACAATGATCCTACGACCTATTATCCTGTATTAGTGAACCTTTGA
 HG564_4 CGGATTCTGCGACG---GAGATGGC---ACGACTTACTATCCGGTATTGGTGAACCTATGA
 D38373_4_ CGGATTCTGCGACG---GAGATGGC---ACGACTTACTATCCGGTATTGGTGAACCTATGA
 AB027294_5_ AGGCTATTGCGATG---GCAATGCC---ATTACGTATTACCCAGTATTGGTTAACTATAA
 * * * * * * *

1200

ภาพประกอบ 11 (ต่อ) การจัดเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิดต่างๆ

TDC285_2 CAGCAACAACCTATACTTATGACAATGGTTATACGCCTAAGAAT---AAAATTGAGCGTAA
 TDC275_2 CAGCAACAACCTATACTTATGACAATGGCTATACGCCTAAGAAT---AAAATTGAGCGTAA
 OMZ409_2 CAGCAACAACCTATACTTATGACAATGGTTATACGCCTAAGAAT---AAAATTGAGCGTAA
 OMZ314_2 CAGCAACAACCTATACTTATGACAATGGTTATACGCCTAAGAAT---AAAATTGAGCGTAA
 6/26_3 GAGCAATAATTACACCT---ACACAGGTGAGGCTGTTGAGAAAGGAAAAATCGTTCGTAA
 ATCC49417_3 GAGCAATAATTACACCT---ACACAGGTGAGGCTGTTGAGAAAGGAAAAATCGTTCGTAA
 HG564_4 TGGCAATGGCTACATCTATTACAGGTGCTATTACCCAAGGACAAAAACAAAATCGTTCGCAA
 D38373_4_ TGGCAATGGCTACATCTATTACAGGTGCTATTACCCAAGGACAAAAACAAAATCGTTCGCAA
 AB027294_5_ TGTTTATGGATATACCTACACTGGAGAGAATAC---AGGGCTGAACAAAATTCCTCGCAA
 * * ** * *

BH18/10_1 CCATAAGTATGATATTAAGTTGACAATTACAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 381_1 CCATAAGTATGATATTAAGTTGACAATTACAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 HG1691_1b CCATAAGTATGATATTAAGTTGACAATTACAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 TDC285_2 CCATAAGTATGATATTAAGCTGACAATCACAAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 TDC275_2 CCATAAGTATGATATTAAGTTGACAATTACAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 OMZ409_2 CCATAAGTATGATATTAAGTTGACAATTACAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 OMZ314_2 CCATAAGTATGATATTAAGTTGACAATTACAGGCCCGGAACGAATAACCCAGAGAATCC
 6/26_3 CCATAAGTTCGACATCAACCTGACGATCACCAGTCTCTGGCAGCAATAATCCTGAAAACCC
 ATCC49417_3 CCATAAATTCGACATCAACCTGACGATCACCAGTCTCTGGTACGAATAATCCTGAAAACCC
 HG564_4 CAACCACTACAAGATTACGCTGAACATCACCAGTCTCTGGTACGAATAATCCTGAAAATCC
 D38373_4_ CAACCACTACAAGATTTGCTGAACATCACCAGTCTCTGGTACGAATAATCCTGAAAATCC
 AB027294_5_ CAACCATTACAAAATCTCATTGACGGTGAAAGTCTCTGGAACGAATACGCTGAAGGACC
 *

BH18/10_1 TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTACAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 381_1 TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTACAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 HG1691_1b TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTACAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 TDC285_2 TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTAAAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 TDC275_2 TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTACAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 OMZ409_2 TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTACAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 OMZ314_2 TATCACAGAGTCTGCTCACTTGAATGTACAGTGCACTGTAGCTGAGTGGGTTCTCGTTGG
 6/26_3 CATTACTGAGTCTGCTAACCTCAACGTTAATTGTGTGGTTGCTGCATGGAAAGGTGTTGT
 ATCC49417_3 CATTACTGAGTCTGCTAACCTCAACGTTAATTGTGTGGTTGCTGCCTGGAAAGGTGTTGT
 HG564_4 TCAACCGGTACAAGCCAACCTGAATGTTACTTGCCAAGTTACACCTTGGGTTGTTGTTAA
 D38373_4_ TCAACCGGTACAAGCCAACCTGAATGTTACTTGCCAAGTTACACCTTGGGTTGTTGTTAA
 AB027294_5_ TCTGCCTGAAGAAGCTAATCTGAACGTTAAGTGTGAGGTTGTTTCTTGGAAAGTTGTTAA
 * * ** * * * * * * * * * * * * * * * *

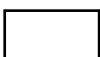
BH18/10_1 TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 381_1 TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 HG1691_1b TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 TDC285_2 TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 TDC275_2 TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 OMZ409_2 TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 OMZ314_2 TCAGAATGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 6/26_3 ACAAATGTTATTTGGTAATCGAGCTCATCAAA-----AACTTTTCATAGTTTGTCTA
 ATCC49417_3 ACAAATGTTATTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 HG564_4 TCAGGCTGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 D38373_4_ TCAGGCTGCTACTTGGTAATCGACCCGTCAAACGACTAAAAAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 AB027294_5_ CCAAAGTGCCATTTGG-AATTAAGAATCAAAAAGA--AAGAACTTTTCATAGTTTGTCTA
 ** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * *

BH18/10_1 -----
 381_1 -----
 HG1691_1b TATTCGGAATACAGGGAG-----
 TDC285_2 TATTCGGAATACAGGGAGAACTACTAGT
 TDC275_2 TATTCGGAATACAGGGAGAACTACTAG-
 OMZ409_2 -----
 OMZ314_2 -----
 6/26_3 -----
 ATCC49417_3 -----
 HG564_4 -----
 D38373_4_ -----
 AB027294_5_ TATTCGGAATACAGGGAG-----

ภาพประกอบ11 (ต่อ) การจัดเรียงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอของฟิมเบรียชนิดต่างๆ

ในภาพประกอบ11 เป็นการแสดงถึงการจัดเรียงลำดับเบสของฟิมเบรียชนิดต่างๆจากโปรแกรมจัดเรียงลำดับเบสคลัสตอลเอ็กซ์ ในภาพจะพบสัญลักษณ์

* หมายถึง ตำแหน่งที่มีเบสตรงกันในแต่ละสายดีเอ็นเอที่นำมาจัดเรียง

 หมายถึง บริเวณที่นำมาออกแบบเป็นนำมาใช้เป็นฟอร์เวิร์ดยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย

..... หมายถึง บริเวณที่มีการเข้าตัดของเอนไซม์เฮ3

จากภาพประกอบ11 จะไม่พบตำแหน่งที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เฮ3 เนื่องจากการไม่มีการจัดเรียงเบส GGCC ในสายดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรียชนิดดังกล่าว ดังนั้นขนาดของชิ้นดีเอ็นเอจึงมีขนาดเท่ากับขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เดิมก่อนถูกตัดด้วยเอนไซม์เฮ3 คือขนาด 1220 คู่เบส (ภาพประกอบ12)

1220

ภาพประกอบ12 ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการศึกษาด้วยไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย

ในการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียจะนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียมาทำการวิเคราะห์โดยการตัดของเอนไซม์ที่มีความจำเพาะ ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กัน ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะคือเอนไซม์เฮ3 เพื่อการแยกชนิดของฟิมเบรียชนิดที่ 1-5 และ 1 ปี (ภาพประกอบ13) และใช้เอนไซม์อาร์ซา1 เพื่อยืนยันยีนฟิมเบรียชนิดที่ 5 (ภาพประกอบ14)

250	20	605	150	150
-----	----	-----	-----	-----

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนฟิมเบรียชนิดที่ 1 ภายหลังการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

250	20	630	150	165
-----	----	-----	-----	-----

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนฟิมเบรียชนิดที่ 1 ปี ภายหลังการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

ภาพประกอบ13 ขนาดชิ้นดีเอ็นเอของยีนฟิมเบรียชนิดต่าง ๆ ภายหลังจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกตัดด้วยเอนไซม์เฮ3

250	20	780	165
-----	----	-----	-----

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนพิมเบรียชนิดที่ 2 ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

250	20	945
-----	----	-----

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนพิมเบรียชนิดที่ 3 ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

130	190	735	165
-----	-----	-----	-----

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนพิมเบรียชนิดที่ 4 ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

1220

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนพิมเบรียชนิดที่ 5 ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เฮ3

ภาพประกอบ13 (ต่อ) ขนาดชั้นดีเอ็นเอของยีนพิมเบรียชนิดต่างๆ ภายหลังจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ถูกตัดด้วยเอนไซม์เฮ3

พิมเบรียชนิดที่ 5 ไม่พบการเข้าตัดของเอนไซม์เฮ3 จึงได้ชั้นดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เฮ3 ดังกล่าวเป็นยีนพิมเบรียชนิดที่ 5 จึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำปฏิกิริยาต่อด้วยเอนไซม์อาร์ซา1 เอนไซม์ชนิดนี้จะเข้าตัดสายดีเอ็นเอ ของพิมเบรียที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบส GTAC ดังนั้นเมื่อทำการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เป็น พิมเบรียชนิดที่ 5 ด้วยเอนไซม์อาร์ซา1 และนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจะพบแถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 230 และ 980 คู่เบส (ภาพประกอบ14)

230	980
-----	-----

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนพิมเบรียชนิดที่ 5 ภายหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อาร์ซา1

ภาพประกอบ14 ขนาดชั้นดีเอ็นเอของยีนพิมเบรียชนิดต่างๆที่5 ภายหลังจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ถูกตัด ด้วยเอนไซม์อาร์ซา1

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรีย พบว่าสามารถตรวจพบยีนฟิมเบรีย 24 ตัวอย่างจากตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 125 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 19.20 การพบดีเอ็นเอของฟิมเบรียทั้งหมดเป็นการพบจากคราบจุลินทรีย์ที่ได้ทำการเก็บจากผู้ป่วยที่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 8 ราย ซึ่งถือว่าเป็นการตรวจพบที่น้อยเกินกว่าที่ควรจะเป็น อย่างไรก็ตามในการศึกษาค้างนี้มีพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐาน เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้น คือ ATCC33277 ซึ่งเป็นฟิมเบรียชนิดที่ 1 และ W50 ซึ่งเป็นฟิมเบรียชนิดที่ 4 ดังนั้นข้อจำกัดของการศึกษาค้างนี้ คือ พอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐาน (standard strains) ของฟิมเบรียอีก 4 ชนิดที่เหลือ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการศึกษาทดลองได้ ทำให้ยากต่อการหาข้อผิดพลาดในการวิจัยพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐานของฟิมเบรียอีก 4 ชนิดนั้น เป็นสายพันธุ์ที่หาได้ยากในประเทศไทย จึงเป็นอุปสรรคสำคัญในการพัฒนาไพรเมอร์และการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยีนฟิมเบรียของพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส

เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากทั้ง 24 ตัวอย่าง (จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบจำนวน 8 ราย) ที่พบยีนฟิมเบรียจากการศึกษาด้วยยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียมาทำการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียโดยอาศัยเอนไซม์เฮ3 เข้าตัดสายดีเอ็นเออย่างจำเพาะ พบว่าผู้ป่วย 7 รายจะถูกรับฟิมเบรีย 1 ชนิด คือ พบฟิมเบรียชนิดที่ 2 หรือฟิมเบรียชนิด 1บี โดยพบฟิมเบรียชนิดที่ 2 จากคราบจุลินทรีย์ 8 ตัวอย่าง (จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ 2 ราย) และพบฟิมเบรียชนิด 1บี จากคราบจุลินทรีย์จำนวน 14 ตัวอย่าง (จากผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบ 5 ราย) อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยอีก 1 รายที่สามารถตรวจพบฟิมเบรียได้ 2 ชนิด คือ พบทั้งฟิมเบรียชนิดที่ 2 และฟิมเบรียชนิด 1บี ดังเช่นในการศึกษาถึงความชุกของชนิดฟิมเบรียที่พบของ Amano⁽⁶⁾ และ Beikler⁽⁷⁾ ก็สามารถพบฟิมเบรียได้มากกว่า 1 ชนิดจากบุคคลเดียวกัน ซึ่งพบได้ร้อยละ 9.5 และ 6.9 ตามลำดับ

การที่พบฟิมเบรีย 2 ชนิดในบุคคลเดียวกันนี้อาจจะพอกล่าวได้ว่าเป็นการพบพอร์ไฟโรโมแนส จิงจิवालิส 2 สายพันธุ์ในบุคคลเดียวกัน จากการศึกษาค้างของ Asano⁽⁸⁾ และ Griffen⁽¹⁹⁾ ได้กล่าวในทำนองเดียวกันว่า โดยปกติในช่องปากของบุคคลใดก็ตามจะพบเชื้อชนิดเดียวกันเพียงสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น แต่โอกาสในการพบเชื้อชนิดเดียวกันมากกว่า 1 สายพันธุ์ อาจเกิดขึ้นได้บ้างทั้งในกลุ่มที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ โดยในกลุ่มไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบจะมีโอกาสพบได้น้อยกว่า แม้ว่าจะพบเชื้อชนิดเดียวกันมากกว่า 1 สายพันธุ์ แต่เชื้อเหล่านั้นจะมีสายพันธุ์หนึ่งที่เด่นกว่าสายพันธุ์อื่นๆ และมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมกับตัวมันเองเพื่อการดำรงอยู่และยับยั้งการเจริญของเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งป้องกันเชื้อสายพันธุ์อื่นไม่ให้เข้ามาเกาะกลุ่มเพิ่ม จากการพบฟิมเบรีย 2 ชนิดจากตัวอย่างเดียวกัน นอกจากจะกล่าวหาพบเชื้อ 2 สายพันธุ์ดังที่กล่าวมาแล้ว อีกนัยหนึ่งอาจจะกล่าวได้ว่า ตัวอย่างดังกล่าวอาจจะพบฟิมเบรียเพียง 1 ชนิดเท่านั้น แต่ฟิมเบรียชนิดที่พบมีลักษณะแตกต่างจากฟิมเบรียชนิดอื่นๆ กล่าวคือ มีขนาดดีเอ็นเอที่คล้ายกับฟิมเบรียชนิดที่ 2 และชนิด 1บี ซึ่งประเด็นนี้คงต้องทำการศึกษาต่อไป

เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ จากการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของฟิมเบรียของ Amano และคณะ⁽⁶⁾ ในปี ค.ศ. 1999 พบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 2 ร้อยละ 58.9 พบทั้งฟิมเบรียชนิดที่ 1 และ 2 ร้อยละ 6.8 พบทั้งฟิมเบรียชนิดที่ 2 และ 4 ร้อยละ 2.7 ไม่สามารถระบุชนิดได้ร้อยละ 6.8 นอกจากนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบอีกว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 สามารถพบได้มากขึ้นในร่องลึกปริทันต์ที่มีความลึกมากยิ่งขึ้นและฟิมเบรียชนิดที่ 2 นี้จะมีความเด่นในผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบและมีความเกี่ยวข้องกับการลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบ การศึกษาครั้งนี้ของ Amano ได้ทำการคิดค้นโปรแกรมที่จำเพาะต่อฟิมเบรียชนิดที่ 1-4 ขึ้นมา โปรแกรมชุดดังกล่าวมีความไวแม้จะพบเชื้อเพียง 5-50 เซลล์ก็ตาม จากนั้นในปี ค.ศ. 2000 Amano และคณะ⁽⁶¹⁾ ได้ทำการศึกษาถึงความชุกของชนิดฟิมเบรียในกลุ่มเป็นโรคปริทันต์อักเสบพบฟิมเบรียชนิดที่ 2 ได้ร้อยละ 66.1 และผลของการศึกษาพบว่าสถานะของเนื้อเยื่อปริทันต์มีความสัมพันธ์กับชนิดของฟิมเบรีย ต่อมาในปี ค.ศ. 2000 Nakagawa และคณะ⁽⁵³⁻⁵⁴⁾ ได้พบฟิมเบรียชนิดที่ 5 ซึ่งพบในกลุ่มคนไข้โรคปริทันต์อักเสบพบได้ ร้อยละ 16.4 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบ

ส่วนฟิมเบรียชนิด 1 ปีฎุรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 2002 ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปริทันต์อักเสบที่ด้อยสมรรถภาพ โดยพบว่าฟิมเบรียชนิด 1 มีความสัมพันธ์เป็นอย่างมากกับการลุกลามของโรคปริทันต์อักเสบเช่นเดียวกับฟิมเบรียชนิดที่ 2 และ 4 สอดคล้องกับการศึกษาชิ้นต่อมาของ Amano และคณะ⁽⁷⁹⁾ ในปี ค.ศ. 2003 ที่พบว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 ของพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดและการดำเนินไปของโรคปริทันต์อักเสบและพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่มีฟิมเบรียชนิดที่ 2 นี้มีความสามารถในการเกาะติดและรุกรานเซลล์เยื่อบุผิวได้มากกว่าพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสที่มีฟิมเบรียชนิดอื่นๆ ต่อมาในปี ค.ศ. 2004 จากการศึกษาของ Nakano และคณะ⁽⁸⁰⁾ พบว่าฟิมเบรียชนิดที่ 2 มีผลให้เกิดการหลังกรดไขมันอิสระจากซีรัมได้มากกว่าฟิมเบรียชนิดอื่นๆ ซึ่งกรดชนิดนี้ทำให้เกิดการอักเสบ ในขณะที่ฟิมเบรียชนิดที่ 1 และ 3 มีผลทำให้เกิดการอักเสบได้น้อยกว่าฟิมเบรียชนิดอื่นๆ

การศึกษาที่ได้กล่าวมาเป็นการศึกษาถึงความชุกของฟิมเบรียในกลุ่มตัวอย่างชาวญี่ปุ่น ในประเทศแถบตะวันตกก็มีความสนใจในการศึกษาในเรื่องของฟิมเบรียเช่นกัน โดยในปี ค.ศ. 2003 Beikler และคณะ⁽⁷⁾ ได้ทำการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างชาวเยอรมัน พบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 1 ร้อยละ 25.5 พบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 2 ร้อยละ 38.2 พบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 3 ร้อยละ 4.9 พบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 4 ร้อยละ 18.6 และพบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 5 ร้อยละ 3.9 ไม่สามารถระบุชนิดได้ร้อยละ 6.9 นอกจากนั้นยังพบฟิมเบรีย 2 ชนิดในผู้ป่วยรายเดียวกันคือพบชนิดที่ 2 และ 4 (พบร้อยละ 2) และพบฟิมเบรียชนิดที่ 3 และ 4 (พบร้อยละ 2) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Beikler⁽⁷⁾ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างชนิดของฟิมเบรียที่พบกับความรุนแรงของโรคปริทันต์อักเสบและค่าทางคลินิกที่บันทึกได้ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Amano^(6,61) และ Nakagawa⁽⁵³⁻⁵⁴⁾ ในการศึกษาของ Beikler⁽⁷⁾ ในครั้งนี้จะมีการแยกชนิดของฟิมเบรียชนิดที่ 1 และ 2 ที่ต่างออกไปจากการศึกษาอื่นๆ โดยจะมีการนำเอนไซม์มาตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ จากการศึกษาที่เรื่องความชุกของชนิดฟิมเบรียที่ผ่านมาไม่พบการรายงานถึงความชุก

ของฟิมเบรียชนิด 1 ปี จนกระทั่งการศึกษาของ Missailidis และคณะในปี ค.ศ. 2004 ⁽⁸¹⁾ พบความชุกของฟิมเบรียชนิด 1 ปี ร้อยละ 19.60 และพบความชุกของฟิมเบรียชนิดที่ 2 ร้อยละ 39.30

สืบเนื่องจากผลการวิเคราะห์ความชุกของฟิมเบรียไม่สามารถได้ผลตามที่วางแผนไว้ในระเบียบและวิธีการวิจัย แม้ว่าจะได้ทำการแก้ไขโดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นใหม่แล้วก็ตาม จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมอีกส่วนหนึ่ง คือ ทำการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Instagene Matrix โดยเป็นดีเอ็นเอที่ตรวจพบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสจำนวน 19 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียด้วยวิธีการใช้ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 3 วิธี ซึ่งปรากฏว่าผลจากวิธีที่ 2 สามารถวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียได้จำนวนตัวอย่างที่มากกว่าและถูกต้องกว่าอีก 2 วิธี และเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ในช่วงต้นที่ใช้วิธีที่ 2 กับตัวอย่างที่ได้จากชุดสกัดดีเอ็นเอ พบว่าตัวอย่างที่ได้จากการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจะสามารถทำการวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียได้มากกว่า

การศึกษาวิเคราะห์ชนิดของฟิมเบรียโดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัด Instagene Matrix จะสามารถระบุชนิดของฟิมเบรียได้มากกว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ร่วมกับการต้ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Matto และคณะในปี ค.ศ. 1998 ⁽⁶²⁾ ที่กล่าวว่า การสกัดดีเอ็นเอที่ใช้การต้มจะมีสารต่างๆเจือปนอยู่มาก (รวมทั้งส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์ที่หลุดออกมาเมื่อเกิดการแตกของเซลล์) ทำให้มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR inhibition) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ ทั้งนี้เนื่องจากในชุดสกัดดีเอ็นเอจะมีเรซิน (Chelex resin) เป็นส่วนประกอบซึ่งเรซินดังกล่าวสามารถจัดสิ่งเจือปนต่างๆโดยจะเข้าจับและดูดซับส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์ที่หลุดออกมา ⁽⁸²⁾ ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอที่อยู่ในสารละลายมีความบริสุทธิ์มากขึ้นและสามารถนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

ผลการศึกษาพบว่าชนิดของฟิมเบรียที่พบจะมีความหลากหลายมากขึ้นกว่าการวิเคราะห์ช่วงต้น คือ พบได้ทั้งชนิดที่ 1 ถึง ชนิดที่ 4 รวมทั้งชนิด 1 ปีด้วย อย่างไรก็ตามจะสังเกตได้จากตัวอย่างดังกล่าวไม่พบฟิมเบรียชนิดที่ 5 และยังมีอีก 4 ตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิส แต่ไม่สามารถระบุชนิดของฟิมเบรียได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Amano ⁽⁶⁾ และ Missailidis ⁽⁸¹⁾ ที่พบฟิมเบรียที่ไม่สามารถระบุชนิดร้อยละ 6.8 และ 17.8 ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองการศึกษานี้สรุปไปในแนวทางเดียวกันว่ามีความเป็นไปได้ที่ยังมีฟิมเบรียชนิดอื่นๆนอกเหนือจากชนิดที่ได้เคยทำการศึกษา คือเป็นฟิมเบรียที่ยังไม่เคยถูกค้นพบ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไปในอนาคต

จากผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบฟิมเบรียชนิดที่ 5 เลย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไม่มีฟิมเบรียชนิดนี้ในคนไทยหรือเกิดปัญหากับไพรเมอร์ที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ฟิมเบรียชนิดนี้ได้ ข้อยกจำกัดในการวิจัยที่สำคัญ คือ มีพอร์ไฟโรโมแนส จึงจิวาลิสสายพันธุ์มาตรฐานเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นในการเป็นตัวควบคุมบวก อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการตรวจเพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่ 3 ซึ่งใช้ยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์สำหรับยีนฟิมเบรียมาทำการวิเคราะห์ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของฟิมเบรีย กล่าวคือ เมื่อต้องการทราบชนิดของฟิมเบรียที่แน่นอนนอกจากการนำไปตัดด้วยเอนไซม์เฮ3 แล้ว ทางผู้วิจัยจึงได้นำไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของฟิมเบรียมาทำการ

วิเคราะห์ต่อเพื่อเป็นการยืนยันชนิดของฟิล์มเบรียที่พบ ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียที่ตรงกับ การตัดด้วยเอนไซม์เฮ3 และตรงกับการวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของ ฟิล์มเบรียเพียงอย่างเดียว รวมทั้งการตรวจสอบกับสายพันธุ์มาตรฐานที่มีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ ชนิดที่ 1 และ 4 ก็ให้ผลการศึกษาที่ถูกต้องตรงกัน (ตาราง9)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรียจากดีเอ็นเอที่ได้จากชุดสกัด Instagene Matrix จะสามารถระบุชนิดของฟิล์มเบรียได้มากขึ้นก็ตาม แต่ตัวอย่างที่นำมาศึกษา เพิ่มเติมนี้มีเพียง 19 ตัวอย่างเท่านั้น จึงยังไม่สามารถที่จะบอกถึงความชุกหรือความสัมพันธ์ทาง คลินิกได้เลย และการศึกษาครั้งนี้ยังคงขาดพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสสายพันธุ์มาตรฐานซึ่งเป็น ตัวแทนของฟิล์มเบรียชนิดต่างๆอีกหลายสายพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาวิเคราะห์ถึงชนิดของฟิล์มเบรียใน อนาคตจึงสมควรที่จะทำการศึกษาวิเคราะห์และเก็บข้อมูลในตัวอย่างที่มีจำนวนมากยิ่งขึ้น และหาก สามารถหาเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานเพิ่มขึ้นได้ คาดว่าจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

บทสรุป

ความชุกของพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิสที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าได้ผลการศึกษาที่ มีความใกล้เคียงกับการศึกษาอื่นๆ ทั้งในการศึกษาถึงความชุกของเชื้อที่ได้ทำในประเทศไทยหรือ การศึกษาที่ทำในประเทศอื่นๆ ส่วนการวิเคราะห์ชนิดของฟิล์มเบรีย พบว่าสามารถระบุชนิดของ ฟิล์มเบรียจากตัวอย่างที่พบพอร์ไฟโรโมนเนส จิงจิवालิส ทั้งจากผู้ที่เป็นและไม่เป็นโรคปริทันต์อักเสบ ได้เป็นชนิดที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีจำนวนน้อยเกินกว่าที่ จะใช้สรุปเป็นความชุกหรือหาความสัมพันธ์กับความรุนแรงทางคลินิกตามที่ได้วางแนวทางไว้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- 1.Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J Periodontol 1992;63(4 Suppl):338-55.
- 2.Scannapieco FA. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. J Periodontol 1998;69(7):841-50.
- 3.Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: implications for future treatment strategies. J Periodontol 1993;64(8 Suppl):792-806.
- 4.Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000 1994;5:78-111.
- 5.Loomer PM, Sigusch B, Sukhu B, Ellen RP, Tenenbaum HC. Direct effects of metabolic products and sonicated extracts of *Porphyromonas gingivalis* 2561 on osteogenesis in vitro. Infect Immun 1994;62(4):1289-97.
- 6.Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. J Clin Microbiol 1999;37(5):1426-30.
- 7.Beikler T, Peters U, Prajane S, Prior K, Ehmke B, Flemmig T F. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in Caucasians. Eur J Oral Sci 2003;111(5):390-4.
- 8.Asano H, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Relationship between transmission of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* type in spouses. J Periodontol 2003;74(9):1355-60.
- 9.Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000 1997;14:12-32.
- 10.Goulbourne PA, Ellen RP. Evidence that *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. J Bacteriol 1991;173(17):5266-74.
- 11.Lamont RJ, Gil S, Demuth DR, Malamud D, Rosan B. Molecules of *Streptococcus gordonii* that bind to *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology 1994;140(Pt 4):867-72.

- 12.Lamont RJ, Hersey SG, Rosan B. Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral *streptococci*. Oral Microbiol Immunol 1992;7(4):193-7.
- 13.Nagata H, Murakami Y, Inoshita E, Shizukuishi S, Tsunemitsu A. Inhibitory effect of human plasma and saliva on co-aggregation between *Bacteroides gingivalis* and *Streptococcus mitis*. J Dent Res 1990;69(8):1476-9.
- 14.Grenier D. Demonstration of a bimodal coaggregation reaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. Oral Microbiol Immunol 1992;7(5):280-4.
- 15.Kinder SA, Holt SC. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. Infect Immun 1989;57(11):3425-33.
- 16.Yao ES, Lamont RJ, Leu SP, Weinberg A. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. Oral Microbiol Immunol 1996;11(1):35-41.
- 17.Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontology 2000 1999; 20:168-238.
- 18.Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 1996;11(4):266-73.
- 19.Griffen AL, Lyons SR, Becker MR, Moeschberger ML, Leys EJ. *Porphyromonas gingivalis* strain variability and periodontitis. J Clin Microbiol 1999;37(12):4028-33.
- 20.Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, et al. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. J Periodontol 1996;67(2):109-15.
- 21.Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodontology 2000 2002;30:61-9.
- 22.Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, et al. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and its role in the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000 1997;14:79-111.
- 23.Greenstein G, Lamster I. Bacterial transmission in periodontal diseases: a critical review. J Periodontol 1997;68(5):421-31.
- 24.Petit MD, van Steenberg TJ, Timmerman MF, de Graaff J, van der Velden U. Prevalence of periodontitis and suspected periodontal pathogens in families of adult periodontitis patients. J Clin Periodontol 1994;21(2):76-85.

- 25.Loos BG, Mayrand D, Genco RJ, Dickinson DP. Genetic heterogeneity of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by genomic DNA fingerprinting. J Dent Res 1990;69(8):1488-93.
- 26.Menard C, Mouton C. Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Infect Immun 1995;63(7):2522-31.
- 27.Teanpaisan R, Douglas CW, Eley AR, Walsh TF. Clonality of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from periodontally diseased and healthy sites. J Periodontal Res 1996;31(6):423-32.
- 28.Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol Mol Biol Rev 1998;62(4):1244-63.
- 29.Mouton C, Hammond PG, Slots J, Genco R. Serum antibodies to oral *Bacteroides asaccharolyticus (Bacteroides gingivalis)*: relationship to age and periodontal disease. Infect Immun 1981;31(1):182-92.
- 30.Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, Suzuki T. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. J Bacteriol 1984;160(3):949-57.
- 31.Lee JY, Sojar HT, Bedi GS, Genco RJ. *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbrillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. Infect Immun 1991;59(1):383-9.
- 32.Hamada N, Watanabe K, Sasakawa C, Yoshikawa M, Yoshimura F, Umemoto T. Construction and characterization of a *fimA* mutant of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 1994;62(5):1696-704.
- 33.Weinberg A, Belton CM, Park Y, Lamont RJ. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect Immun 1997;65(1):313-6.
- 34.Amano A, Sharma A, Lee JY, Sojar HT, Raj PA, Genco RJ. Structural domains of *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbrillin that mediate binding to salivary proline-rich protein and statherin. Infect Immun 1996;64(5):1631-7.
- 35.Amano A, Shizukuishi S, Horie H, Kimura S, Morisaki I, Hamada S. Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. Infect Immun 1998;66(5):2072-7
- 36.Murakami Y, Iwahashi H, Yasuda H, Umemoto T, Namikawa I, Kitano S, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbrillin is one of the fibronectin-binding proteins. Infect Immun 1996;64(7):2571-6.

37. Sojar HT, Hamada N, Genco RJ. Structures involved in the interaction of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and human lactoferrin. *FEBS Lett* 1998;422(2):205-8.
38. Evans RT, Klausen B, Sojar HT, Bedi GS, Sfintescu C, Ramamurthy NS, et al. Immunization with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. *Infect Immun* 1992;60(7):2926-35.
39. Malek R, Fisher JG, Caleca A, Stinson M, van Oss CJ, Lee JY, et al. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis fimA* gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *J Bacteriol* 1994;176(4):1052-9.
40. Chandad F, Mouton C. Antigenic, structural, and functional relationships between fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1995;63(12):4755-63.
41. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. *J Periodontol Res* 2003;38(6):591-6.
42. Otogoto JI, Kuramitsu HK. Isolation and characterization of the *Porphyromonas gingivalis prtT* gene, coding for protease activity. *Infect Immun* 1993;61:117-23.
43. Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 1994;269:21371-8.
44. Laosrisin N, Nakashima K, Ishikawa I. Detection of *Bacteroides gingivalis* antigenic proteins by immunoblotting analysis. *J Periodontol* 1990;61(5):261-8.
45. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;100(1):6-10.
46. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 1995;63(10):3878-85.
47. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 1993;61(5):2260-5.
48. Lamont RJ, Oda D, Persson RE, Persson GR. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7(6):364-7.
49. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontol Res* 2004;39(2):136-42.

50. Nakagawa I, Amano A, Kuboniwa M, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Functional differences among FimA variants of *Porphyromonas gingivalis* and their effects on adhesion to and invasion of human epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70(1):277-85.
51. Laine ML, van Winkelhoff AJ. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13(5):322-5.
52. Sundqvist G, Figdor D, Hanstrom L, Sorlin S, Sandstrom G. Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res* 1991;99(2):117-29.
53. Nakagawa I, Amano A, Kimura RK, Nakamura T, Kawabata S, Hamada S. Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gingivalis* carrying a new type of *fimA* gene. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1909-14.
54. Nakagawa I, Amano A, Ohara-Nemoto Y, Endoh N, Morisaki I, Kimura S. Identification of a new variant of *fimA* gene of *Porphyromonas gingivalis* and its distribution in adults and disabled populations with periodontitis. *J Periodontal Res* 2002;37(6):425-32.
55. Kokeguchi S, Miyamoto M, Ohyama H, Hongyo H, Takigawa M, Kurihara H, et al. Biochemical properties of the major outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbios* 1994;77(313):247-52.
56. Kawata Y, Hanazawa S, Amano S, Murakami Y, Matsumoto T, Nishida K, et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae stimulate bone resorption in vitro. *Infect Immun* 1994;62(7):3012-6.
57. Loe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J Periodontol* 1967;38(Suppl):610-6
58. Miller S. Oral diagnosis and treatment planning. In: Miller S, editor. Philadelphia: Blakiston 1936:7.
59. Nozaki T, Kusumoto Y, Kitamura M, Hirano H, Kohyama A, Hayakawa M, et al. A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction and its possible clinical application. *J Periodontol* 2001;72(9):1228-35.
60. Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeka K. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 2005;40(2):147-52.

- 61.Amano A, Kuboniwa M, Nakagawa I, Akiyama S, Morisaki I, Hamada S. Prevalence of specific genotypes of *Porphyromonas gingivalis fimA* and periodontal health status. J Dent Res 2000;79(9):1664-8.
- 62.Matto J, Saarela M, Alaluusua S, Oja V, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. J Clin Microbiol 1998;36(1):157-60.
- 63.Chanchaimongkon L. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* by polymerase chain reaction in Thai subjects with different periodontal status. Master of Science Thesis in Periodontology, Graduate School,KhonKaen University 2005.
- 64.Klein MI, Goncalves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. J Periodontol 2003;74(6):798-802.
- 65.Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, Maeka K. Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. J Periodontol 2002;73(11):1253-9.
- 66.Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T, et al. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. Oral Microbiol Immunol 2004;19(5):289-92.
- 67.Van der Ploeg JR, Giertsen E, Ludin B, Morgeli C, Zinkernagel AS, Gmur R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque. FEMS Microbiol Lett 2004;232(1):31-7.
- 68.Takeuchi Y, Umeda M, Ishizuki M, Huang Y, Ishikawa I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. J Periodontol 2003;74(10):1460-9.
- 69.Avila-Campos MJ, Velasquez-Melende G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 2002;44:1-5
- 70.Ishizuka M. [Identification of periodontopathic bacteria DNA from periodontitis-involved gingival tissue using a PCR method]. Kokubyo Gakkai Zasshi 2002;69(1):15-26.
- 71.Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol 2001;72(10):1354-63.

72. Doungudomdacha S, Rawlinson A, Walsh TF, Douglas TW. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. J Clin Periodontol 2001;28(5):437-45.
73. Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. J Periodontal Res 2001;36(1):18-24.
74. Choi BK, Park SH, Yoo YL, Choi SH, Chai JK, Cho KS. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. J Periodontol 2000;71(9):1387-94.
75. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. J Clin Periodontol 2000;27(6):417-24.
76. Kasuga Y, Ishihara K, Okuda K. Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. Bull Tokyo Dent Coll 2000;41(3):109-17.
77. Leys EJ, Griffen AL, Strong SJ, Fuerst PA. Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. J Clin Microbiol 1994;32(5):1288-94.
78. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. J Clin Periodontol 2004;31:1034–47.
79. Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. J Periodontol 2003;74(1):90-6.
80. Nakano K, Kuboniwa M, Nakagawa I, Yamamura T, Nomura R, Okahashi N, et al. Comparison of inflammatory changes caused by *Porphyromonas gingivalis* with distinct *fimA* genotypes in a mouse abscess model. Oral Microbiol Immunol 2004;19(3):205-9.
81. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Mayer MPA. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. Oral Microbiology and Immunology 2004;19(4):224-229

82.Nucleicacid and protein sample preparation: Multipurpose DNA extraction. Life science research products (BIO-RAD) 2002/03:254

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	พลภัทร์ จรัสชัยวรรณ
วัน เดือน ปีเกิด	27 ตุลาคม 2521
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	38-40 ถนนพญาพาน ตำบลพระปฐมเจดีย์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ทันตแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2536 - 2538	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสาริต คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม
พ.ศ. 2539 - 2545	ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2546 - 2549	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาปริทันตวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ